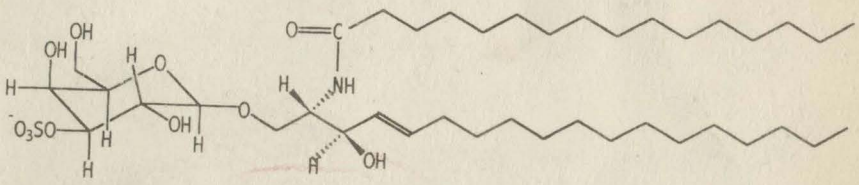
D.P. IGA SILVIA IGA M. ŞERBAN

GLICOLIPIDELE

STRUCTURĂ, METABOLISM, ROL BIOLOGIC



Editura Universității din București
2000

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

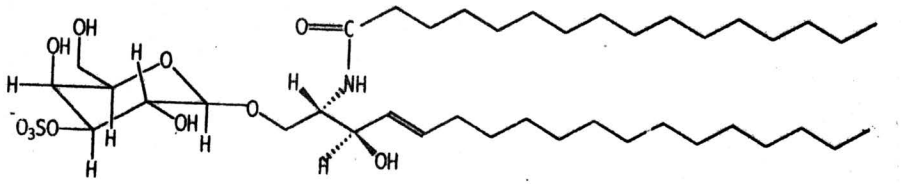
BIBLIOTECA CENTRALĂ
UNIVERSITARA
București
Cota III 472646
Inventar C2000002312

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

D. P. IGA SILVIA IGA M. ŞERBAN

GLICOLIPIDELE

STRUCTURĂ, METABOLISM, ROL BIOLOGIC



EDITURA UNIVERSITĂŢII DIN BUCUREŞTI
2000

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITARĂ
BUCUREŞTI
COTA III 472646
410/00

Referenţi ştiinţifici: Dr. OFELIA GOZIA
Dr. STELIAN NICULESCU

B.C.U. Bucureşti
C20002312

© Editura Universităţii din Bucureşti
Şos. Panduri, 90-92, Bucureşti - 76235; Telefon/Fax 410.23.84

Descrierea CIP a Bibliotecii Naţionale
IGA, DUMITRU-PETRU
Glicolipidele: structură, metabolism, rol biologic / Dumitru-Petre Iga, Silvia Iga, Mihai Şerban - Bucureşti: Editura Universităţii din Bucureşti, 2000
184 p.; 28 cm.,
Bibliogr.
ISBN 973-575-424-X

I. Iga, Silvia
II. Şerban, Mihai

577.1

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

CUPRINS

Introducere
Listă de abrevieri
Nomenclatură
1.Constituenţii glicolipidelor
1.1.Fracţiunea hidrofobă
1.2.Glucidele neutre
1.3.Fracţiunea acidă
2.Glicolipide ale cordatelor
2.1.Monohexozil-ceramide
2.2.Dihexozil-ceramide
2.3.Gangliozide
2.3.1.Elucidarea structurii gangliozidului GM1a
2.3.2.Gangliozidele GD1a şi GD1b
2.3.3.Gangliozidul GT1b
2.3.4.Fuco-glicosfingolipide
2.3.5.Izomeria gangliozidelor
2.3.5.1.Enzime implicate în studiul izomeriei gangliozidelor
2.3.5.2.Oxidarea cu periodat
2.3.5.3.Hidroliza acidă parţială
2.3.5.4.Permetilare-acetoliză
2.3.5.5.Spectrometria de masă
2.3.6.Elaborarea unui model matematic asupra diversităţii moleculare a gangliozidelor
2.3.6.1.Sistematizarea pe computer a structurilor gangliozidelor
2.3.6.2.Forma finală şi semnificaţia ecuaţiei
2.4.Metode actuale utilizate la elucidarea structurii glicosfingolipidelor
2.4.1.Structura fragmentului oligoglucidic
2.4.1.1.Compoziţia glucidică
2.4.1.2.Determinarea secvenţei fragmentului oligoglucidic
2.4.1.3.Configuraţia anomeră
2.4.2.Spectroscopia RMN
2.5.Sulfato-glicosfingolipide
2.5.1.Cerebrozid 3-sulfat
2.5.2.Lactozilceramid sulfat
2.5.3.Trihexozilceramide sulfatate
2.5.4.Gangliotriaozilceramid di-sulfatat
2.5.5.Gangliotetraozilceramid di-sulfatat
2.5.6.Neolactotetraozilceramid sulfat
2.5.7.Sulfo-globo-pentaozilceramid
2.5.8.Glicosfingolipide sulfatate pe bază de acid glucuronic
2.6.Metabolismul glicosfingolipidelor
2.6.1.Biosinteza gangliozidelor
2.6.1.1.Specificitatea de substrat
2.6.2.Catabolismul gangliozidelor
2.6.3.Localizarea celulară a glicosfingolipidelor
2.7.Proteine activatoare şi topologia catabolismului glicosfingolipidelor

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

2.7.1.Activatorul GM2
2.7.2.Proteine derivate din sap-precursor
3.Distribuţia glicolipidelor în lumea vie
3.1.Glicoglicerolipide
3.2.Glicosfingolipide
4.Glicolipide şi fosfolipide ale unor animale inferioare
4.1.Fosfosfingolipide
4.1.1.Fosfonosfingolipide
4.1.2.Ceramid fosfoetanolamina
4.2.Glicosfingolipide
4.2.1.Glicosfingolipide din moluşte
4.2.1.1.Glicosfingolipide din bivalve
4.2.1.2.Glicosfingolipide din melci de mare
4.2.1.3.Glicosfingolipide din iepurele de mare
4.2.2.Glicosfingolipide din artropode
4.2.2.1.Glicosfingolipide de la insecte
4.2.2.2.Glicosfingolipide ale crustaceelor
4.2.3.Glicosfingolipide ale anelidelor
4.2.4.Glicosfingolipide ale echinodermelor
4.2.5.Glicolipide din microorganisme
4.2.5.1.Glicoglicerolipide din microorganisme
5.Agregarea gangliozidelor în soluţii apoase
6.Activitatea biologică a glicolipidelor
6.1.Glicosfingolipidele ca modulatori pentru semnalizarea transmembranară şi mediatori pentru interacţii celulare
6.1.1.Reglarea proliferării celulare şi inducerea diferenţierii de către gangliozide
6.2.Reglarea creşterii celulare de către gangliozide
6.2.1.Sfingozina ca reprezentant al unei noi clase de mesageri secunzi intracelulari
6.3.Metabolismul gangliozidului GM2 în fibroblaşti de la pacienţi cu gangliozidoza GM2
6.4.Diagnoza prenatală a gangliozidozei GM2
6.5.Selectivitatea biologiei mediate de ceramide
6.6.Evidenţierea a două situsuri active diferite pe ß-hexozaminidaza umană
6.7.Maladia Sandhoff datorată unei mutaţii punctiforme
6.8.Glicosfingolipide din tumori
6.9.Acţiuni biologice variate ale glicosfingolipidelor
6.10.Unele funcţii fiziologice ale glicosfingolipidelor
6.10.1.Acţiuni fiziologice ale sulfoglicolipidelor
6.11.Ancore de membrană şi glicolipide ale paraziţilor
6.11.1.Ancore de membrană GPI
6.11.2.Glicolipide ale paraziţilor
7.Sinteza chimică a glicosfingolipidelor.
8.Modificări chimice şi marcarea glicolipidelor.
8.1.Marcarea dihidrosfingozinei
8.2. 3[-^{14}C] şI [1-^{3}H; 3-^{14}C] eritro-DL-dihidrosfingozină
8.3. [7-^{3}H]eritro-DL-Sfingozină
8.4.Marcarea glicosfingolipidelor cu ^{35}S, ^{3}H şI ^{14}C

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Glicoconjugatele sunt compuşi chimici eterogeni ce conţin în molecula lor două tipuri de constituenţi:

- un fragment oligoglucidic
- un fragment aglicon.

Glicoconjugatele se clasifică, în funcţie de natura chimică a fragmentului aglicon în două tipuri:

- glicolipide, la care agliconul este un fragment lipidic
- glicoproteine, la care agliconul este o proteină.

Glicolipidele se clasifică, în funcţie de natura chimică a restului lipidic în trei tipuri:

- glicosfingolipide, al căror fragment lipidic este un ceramid (N-acil gras sfingozină)
- glicoglicerolipide, al căror fragment lipidic este diacil-glicerolul sau alchil-acil-glicerolul
- steril-glicozide, al căror fragment lipidic este un sterol.

Glicosfingolipidele se clasifică în două tipuri:

- glicosfingolipide neutre sau poliglicozil-ceramide
- glicosfingolipide acide, anionul aparţinând acidului sialic, grupării sulfat, acidului glucuronic, etc.

Glicoglicerolipidele sunt şi ele de două feluri, neutre şi acide, aciditatea fiind conferită de regulă de către gruparea sulfat, sulfonat sau de către acizii uronici.

Cel mai ilustrativ indice al importanţei şi anvergurii cercetărilor care vizează glicoconjugatele este gama extrem de largă şi diversă a instrumentarului şi conceptelor de investigaţie a acestei clase de compuşi. Într-o manieră succintă se pot prezenta următoarele exemple:

- În domeniul fizicii a fost necesară asamblarea în ecuaţii noi a unor mărimi fizice cunoscute. Totodată, a fost elaborată o aparatură strict specializată, în care componente cu precizie consacrată, precum laserul, au devenit monedă curentă.
- În terapie, una dintre primele maladii metabolice soluţionate prin mijloace biochimice a fost maladia Gaucher, datorată unui defect de metabolizare a unui glicosfingolipid, glucozil-ceramidul.
- În Biochimie, descoperirea proteinelor activatoare a glicosfingolipidelor a revoluţionat înţelegerea interacţiei enzimă-substrat.
- Găsirea modului de codificare a proteinelor activatoare a glicosfingolipidelor, a enzimelor implicate în metabolismul glicoconjugatelor, a mutaţiilor punctiforme ce cauzează unele maladii genetice utilizează din plin tehnologia DNA recombinant.
- Prin intermediul glicoconjugatelor au fost relevate faţete noi ale interacţiei gazdă-parazit, ale specificităţii de specie, de organ, de ţesut; toate acestea s-au constituit într-o ştiinţă nouă, Glicobiologia.
- În domeniul Chimiei Organice s-a perfecţionat enorm reacţia de glicozilare, atât în sensul stereospecificităţii cât şi a stereoselectivităţii.

O serie de alte procese biologice fundamentale ca:

- procesele imunitare
- creşterea şi diferenţierea celulară
- transformarea şi îmbătrânirea celulelor

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

- procesele de fertilizare

sunt domenii care s-au dezvoltat prin studiul glicoconjugatelor.

Începutul investigaţiilor asupra glicoconjugatelor datează din secolul XIX şi sunt legate de numele unor cercetători consacraţi în istoria ştiinţei: Liebig, Berzelius, Ch. Darwin, F. Hoppe-Seyler, Claude Bernard. Trebuie precizat însă că impactul lor asupra domeniilor conexe a devenit apreciabil odată cu extinderea cantitativă a acestor studii. Momente de referinţă în cadrul cercetărilor glicoconjugatelor sunt următoarele.

Izolarea de către Thudichum (1874) a primului glicolipid, cerebrozidul (galactozil-ceraidul) din creier uman, precum şi demonstraţia că acest compus este constituit din: un acid gras, un glucid şi o bază organică (sfingozina) insolubilă în apă dar solubilă în solvenţi organici, necunoscută până la acea dată. Mai târziu (1935) E. Klenk a găsit un alt tip de glicosfingolipid, conţinând un glucid acid necunoscut (acidul sialic), în creierul pacienţilor cu maladia Tay-Sachs sau Niemann-Pick. Anterior (1925) aceşti compuşi fuseseră descoperiţi de către Landsteiner şi Walz prin reacţia cu N,N-dimetil p-aminobenzaldehidă. Glicosfingolipidele conţinând acid sialic au fost denumite gangliozide de către Klenk (1942), în urma lucrărilor lui Blix (1938) care a demonstrat distribuţia constantă a acestor lipide în
creierul normal. Mai târziu Yamakawa şi Suzuki (1951) au descoperit că gangliozidele se găsesc deasemenea în ţesuturile şi fluidele extraneurale; acest domeniu fiind în prezent studiat intens. Structurile gangliozidelor majore din creier uman normal au fost elucidate la începutul anilor '60 prin elegante investigaţii chimice ale unor cercetători ca: Svennerholm, Kuhn şi Wiegandt, Klenk, Egge, Ledeen, Yu şi alţii.

Globozidul, glicosfingolipidul major din eritrocite umane, a fost izolat şi caracterizat simultan de către două grupuri de cercetători: pe de o parte Klenk şi Lauenstein (1952) iar pe de altă parte, Yamakawa şi Suzuki (1952). Rapport şi colab., (1964, 1967) au izolat un glicosfingolipid (denumit citolipina K) din rinichi uman precum şi un compus înrudit, izoglobozidul (denumit citolipina R) din limfosarcom. Glicosfingolipidele de mai sus, precum şi o substanţă cu structură mai simplă, lactozilceramidul (denumit citolipina H), constituie haptene cu proprietăţi unice. Pe de altă parte s-a constatat că antigenul heterofil, care fusese descris de către Forssman (1911), este deasemenea un glicosfingolipid. În urma constatării ca antigenii din eritrocitele grupelor sanguine A sau B sunt de natură lipidică, a fost elucidată şi structura acestora; s-a găsit că aceşti compuşi cu activităţi imunologice ca substanţe de grup sanguin (specificităţi ABH şi Lewis) sunt glicosfingolipide ce conţin fucoză (Yamakawa şi colab., 1965; Hakomori şi Strycharz, 1968). Elucidarea căilor de biosinteză şi reglare metabolică a glicosfingolipidelor a constituit deasemenea rezultatul efortului mai multor grupuri de cercetători: Morre şi colab., Yu şi Ledeen, Sandhoff şi colab. Identificarea clusterelor de glicosfingolipide (T. W. Tillack şi colab., 1983), capacitatea gangliozidelor de a dobândi, în urma agregării, structură secundară (S. Hakomori şi colab., 1987), relevarea calităţii de markeri tumorali a glicosfingolipidelor (S. Hakomori şi colab., 1982; K. A. Karlsson şi colab., 1983), valoarea terapeutică unică a glicosfingolipidelor (J. C. Samson, 1990) constituie şi astăzi modele de referinţă în privinţa abordării.

O altă linie de cercetare a glicoconjugatelor, care a implicat numeroase laboratoare, este sinteza organică a acestora. A fost necesară soluţionarea a două aspecte: (i) sinteza fragmentului oligoglucidic şi activarea adecvată a acestuia în vederea conexiunii cu agliconul; (ii) sinteza agliconului, implicit zona activată pentru reacţia cu glucidul de
legătură.

Dintre cele două ramuri ale glicoconjugatelor, am ales în lucrarea de faţă glicolipidele. Elucidarea structurii, distribuţia în natură, metabolismul, sinteza organică, constituie capitole de bază. Parcurgerea cu eficienţă a acestei lucrări va trebui să fie precedată de cunoaşterea unor manuale de Chimie Organică. Recomandăm în această privinţă lucrarea "Chimie Bioorganică",

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

autori D. P. Iga şi Silvia Iga, Editura Universităţii Bucureşti, 1996, sau oricare alt manual de Chimie Organică ce tratează compuşii naturali.

Adresăm pe această cale mulţumiri: prof. Dr. K. Sandhoff de la Universitatea din Bonn pentru specializarea pe care autorii au efectuat-o în laboratorul respectiv, prof. Dr P. Kaurannen de la Universitatea din Kuopio, Finlanda, prin a cărui invitaţie a fost facilitată efectuarea spectrelor RMN a glicosfingolipidelor, prof. Dr. K.-A. Karlsson de la Universitatea din Göteborg pentru facilitarea analizelor RMN şi spectrometria de masă.

Eventualele sugestii privind lucrarea de faţă vor fi trimise autorilor pe adresa Facultăţii de Biologie, Bucureşti.

Autorii

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

LISTĂ DE ABREVIERI

AA, aminoacizi
Ac, acetil
AcM, anticorp monoclonal
AEPn, acid aminoetilfosfonic
AG, acid gras
AGH, acid gras hidroxilat
AGM, acid gras mononesaturat
AGN, acid gras cu catenă normală
AMe, adenozil-metionină
AP, acid fosfatidic
Api, apioză
Ar5, arthropentaoză
AS, acid sialic
BAR, bombardare cu atomi rapizi
BCL, bază cu catenă lungă
Bio, biotinil
Bt, butiril
CAEPn, ceramid-aminoetilfosfonat
cAMP, AMP ciclic
CDH, ceramid dihexozil
Cer, ceramid
CGL, cromatografie gaz-lichid
CL, cromatografie în fază lichidă
CMAEPn, ceramid N-metilaminoetilfosfonat
CMH, ceramid monohexozil
CMP-NANA, citidin monofosfo-N-acetilneuraminat
CPEA, ceramid-fosfoetanolamină
CS, cerebrozid sulfat
CSS, cromatografie în strat subțire
DAG, sn-1,2-diacil-glicerol
DeHex, deoxihexoză
DGDG, digalactozil-diglicerid
DMS, dimetilsfingozină
DMSO, dimetil sulfoxid
EGF, factorul de creștere epidermal
Et, etil
f, inel furanozic
FITC, fluoresceinizotiocianat
Fmoc, fluorenil-metil-oxi-carbonil
Fuc, fucoză
Ga2, galabioză
Gal, galactoză
GalNAc, N-acetilgalactozamină
Gb4, globotetraoză
GC-SM, gaz-cromatografie – spectrometrie de masă
GDP, guanidin difosfat
Gg4, gangliotetraoză
GIPL, glicoinozitolfosfolipid

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

GL, glicolipid
Glc, glucoză
GlcA, acid glucuronic
GlcNAc, N-acetilglucozamină
GPI, glicozil-fosfatidil-inozitol
GSL, glicosfingolipid
Hex, hexoză
HPLC, cromatografie lichidă de înaltă performanţă
5HT, 5-hidroxitriptamină
iGb4, izoglobotetraoză
IP3, inozitol trifosfat
IR, infraroşu
Lac, lactoză
Lc4, lactotetraoză
LPG, lipofosfoglican
LPPG, lipopeptidofosfoglican
Man, manoză
MAPP, 2-(N-miristoil-amino)-1-fenil-1-propanol
Mc4, mucotetraoză
Me, metil
MGDG, monogalactozil-diglicerid
*mio*Ino, mioinozitiol
Ml5, mollupentaoză
MM, masă moleculară
MU, metil-umbeliferil
NANA, acid N-acetilneuraminic
Neu5Ac, N-acetilneuraminat
Neu5Gc, N-glicoloilneuraminat
NGNA, ibid.
nLc4, neolactotetraoză
p, inel piranozic
PAG, fosfatidil-glicerol
PKC, protein kinaza C
PnSL, fosfonosfingolipide
PSL, fosfosfingolipide
Rmn, ramnoză
RMN, rezonanţă magnetică nucleară
RMP, rezonanţă magnetică protonică
SM-BAR, spectrometria de masă prin bombardare cu atomi rapizi
SMLC, scanning microscopic cu laser confocal
SNC, sistemul nervos central
SPC, sfingozin-fosforil-colină
Sph, sfingozină
SPh, tiofenil
SphP, sfingozin-fosfat
THC, tetrahexozil-ceramid
TPA, 12-O-tetradecanoil forbol 13 acetat
UDP, uridir. difosfat
uam, unităţi atomice de masă

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Nomenclatură

Nomenclatura glicosfingolipidelor (GSL) urmează sistemul lui Svennerholm (L. Svennerholm, 1964) şi recomandările IUPAC-IUB. În prezent se cunosc mai multe familii de GSL (Tabelul 1). Trebuie adăugat că ultimele patru tipuri sunt de dată recentă (T. Hori şi M. Sugita, 1993). Sufixul "Ose" a fost omis (S. Hakomori, 1993).

Tabelul 1. Clasificarea glicosfingolipidelor

Familie	Abreviere	Structură
Gangliotetraoză	Gg4	Galß1-3GalNAcß1-4Galß1-4Glcß1-1'Cer
Neolactotetraoză	nLc4	Galß1-4GlcNAcß1-3Galß1-4Glcß1-1'Cer
Globotetraoză	Gb4	GalNAcß1-3Galα1-4Galß1- 4Glcß1-1'Cer
Izoglobotetraoză	iGb4	GalNAcß1-3Galα1-3Galß1-4Glcß1-1'Cer
Lactotetraoză	Lc4	Galß1-3GlcNAcß1-3Galß1-4Glcß1-1'Cer
Mucotetraoză	Mc4	Galß1-3Galß1-4Galß1-4Glcß1-1'Cer
Galabioză	Ga2	Galα1-4Galß1-1'Cer
Artropentaoză	Ar5	GalNAcα1-4GalNAcß1-4GlcNAcß1-3Manß1-4Glcß1-1'Cer
MollupentaozăMl5		Fucα1-4GlcNAcß1-2Manα1-3Manß1-4Glcß1-1'Cer
Schisto		GalNAcß1-4Glcß1-1'Cer

1.CONSTITUENŢII GLICOLIPIDELOR

1.1.Fracţiunea hidrofobă

Fracţiunea hidrofobă a glicoglicerolipidelor constă dintr-un fragment 1,2-diacil-sn-3-glicerol sau dintr-un fragment 1-O-alchil-2-O-acil-sn-3-glicerol. Fragmentul hidrofob a GSL este alcătuit din ceramid, N-acil gras sfingozină.

1.1.Glicoglicerolipide. Seminolipidul, 1-O-alchil-2-O-acil-sn-3-(ß-D-galactopiranozil 3'-sulfat)glicerol, din spermatozoizi de vier este extrem de uniform: atât fragmentul alchil cât şi fragmentul acil au aceeaşi lungime a catenei şi anume 16 atomi de carbon (J. P. Vos şi colab., 1994) (Fig. 1).

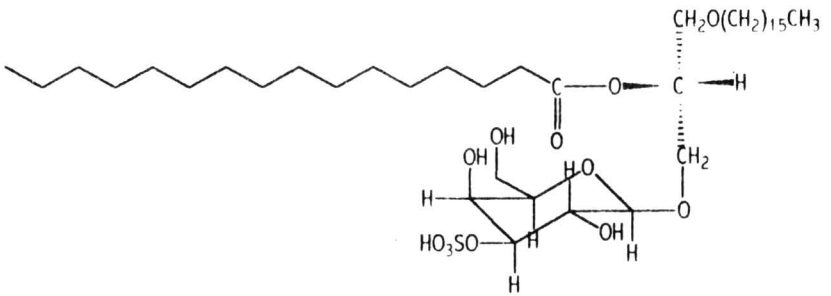


Fig. 1.Seminolipidul din spermatozoizi de vier.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Seminolipidul din creier de şobolan suferă următoarele transformări în funcţie de vârstă: la animalele tinere (până la 19 zile de la naştere) raportul molar diacil/alchil-acil este supraunitar iar după perioada indicată este subunitar. În ceea ce priveşte acizii graşi (AG) ai seminolipidului ei suferă următoarea transformare: la vârsta de 16 zile AG majoritar este acidul stearic dar la vârsta de 68 de zile AG majoritar este acidul oleic; cei doi acizi au aceeaşi concentraţie la 29 de zile (I. Ishizuka şi colab., 1978).

Din peştele de Alaska *Theragra chalcogramma* au fost purificate două glicolipide pe bază de galactozil diacil-glicerol; s-a demonstrat că structura lor este: 1,2-di-O-acil-3-ß(6-O-acil-D-galactopiranozil)-sn-glicerol şi 1,2-di-O-acil-3-ß(2'-O-acil-D-galactopiranozil)-sn-glicerol (Y. Tamai şi colab., 1993).

Specia sn-1,2-diacil-glicerol (DAG) predominantă în toate glicoglicerolipidele din seminţe de fasole Adzuki (*Vigna angularis*) este dilinolenina (M. Kojima şi colab., 1990). O serie de diacil gliceroli din glicoglicerolipidele plantelor sunt prezentate în Tabelul 2 şi în Tabelul 3.

Tabelul 2.Proporţiile de specii moleculare de diacil-gliceroli din MGDG* şi DGDG (izomerii A şi B) din seminţe de fasole Azduki (%).

			Calculat	
Specii DG	MGDG	DGDG	DGDG-A	DGDG-B
18:3 + 18:3	56,0	37,5 (31,8)**	39,1	34,4
18:3 + 18:2	19,8	16,3 (45,0)	13,7	21,2
16:0 + 18:3	1,3	12,7 (21,8)	15,2	8,0
18:2 + 18:2	16,5	14,9 (56,0)	10,0	24,1
18:1 + 18:3	2,4	5,8 (21,1)	6,9	3,7
16:0 + 18:2	0,1	6,0 (23,7)	7,0	4,1
18:1 + 18:2	1,9	2,8 (45,5)	2,3	3,7
18:0 + 18:3	1,8	2,7 (3,8)	4,0	0,3
18:0 + 18:2	0,3	1,3 (15,7)	1,7	0,6

* MGDG este Galß1-3'-diglicerid; DGDG(A) este Galα1-6Galß1-3'diglicerid; DGDG(B) este Galß1-6Galß1-3'diglicerid

** Numerele din paranteză arată procentele izomerului B în DGDG

Tabelul 3.Compoziţia procentuală a speciilor moleculare în fragmentele de 1, 2-diacilglicerol din MGDG şi DGDG A şi B din frunze de gimnosperme.

	Pinus nigra			*Abies sachalinensis*			*Thuja occidentaslis*		
Specii		DGDG			DGDG			DGDG	
Moleculare*	MGDG	A	B	MGDG	A	B	MGDG	A	B
18:4+18:4	-	-	-	0,4	-	-	-	-	-
18:4+18:3	9,5	1,9	6,8	16,6	3,5	26,5	-	0,2	0,7
16:3+18:3	17,3	0,9	10,6	0,9	-	-	17,6	1,2	6,6
18:3+18:3	56,7	50,1	59,9	68,3	57,0	56,8	57,6	55,0	83,7
18:3+20:3	5,1	1,6	7,5	3,2	1,9	5,5	7,1	2,3	5,6
16:2+18:3	1,3	0,4	1,1	-	-	-	4,4	1,0	1,0
18:2+18:3	3,6	4,2	6,8	6,5	3,9	3,9	3,1	2,3	2,3
18:3+20:2	2,1	4,6	5,0	-	5,5	4,7	4,9	1,4	-
18:1+18:3	-	-		1,8	1,3	2,0			-
18:1+18:3	1,2	2,4	1,9	0,9	2,7	0,6	-	-	-
16:0+18:3	2,8	24,4	-	1,4	10,3	-	5,3	32,0	-
18:0+18:3	-	3,6	-	-	5,5	-	-	1,8	-
17:0**+18:3	-	1,3	0,3	-	1,5	-	-	1,2	-

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

17:0**/18:3	-	1,1	0,2	-	4,5	-	-	-	-
16:0/18:2	0,4	3,6	-	-	0,9	-	-	1,6	-
Alţii	-	-	-	-	1,4	-	-	-	-

• Izomerii de poziţie nu au fost determinaţi.

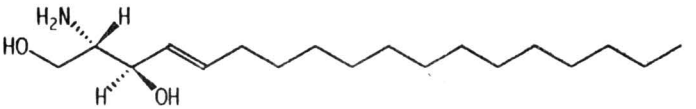
** GC a indicat doi izomeri 17:0, normal şi ramificat, dar plasarea ramificaţiei metil în catenă nu a fost încă stabilită.

1.2.Glicosfingolipide. 1.2.1.Sfingozina (bază cu catenă lungă, BCL). Toate glicosfingolipidele şi fosfosfingolipidele conţin, ca element de structură comun, sfingozina sau unii dintre derivaţii acesteia. Denumirea de sfingozină desemnează un aminoalcool nesaturat, ***trans D-eritro 2-amino 1,3-dihidroxi 4-octadecenă***. Sfingozina a fost izolată prima dată de către Thudichum în anul 1874 din frenosină (un material lipidic provenit din creier). După ce Thierfelder şi Levene, în perioada 1904-1912, au identificat grupările funcţionale ale acestui compus natural, Klenk şi Diebold, în 1929, au determinat lungimea catenei hidrocarbonate şi poziţia legăturii duble. Carter şi colab., au precizat poziţia grupărilor funcţionale şi configuraţiile atomilor de carbon asimetrici. Structura sfingozinei a fost stabilită definitiv prin sinteză totală de către Shapiro şi Grob între anii 1951-1957. Conform nomenclaturii Cahn-Ingold-Prelog sfingozina este *(4E,2S,3R)-2-aminooctadec-4-en-1,3-diol*. Alături de sfingozină au fost găsiţi şi compuşi similari saturaţi şi hidroxilaţi C_{14} -C_{22} ca părţi constitutive a sfingolipidelor; astăzi se cunosc aproximativ 100 de tipuri de sfingozine. În timp ce C_{18}-sfingozina si -dihidrosfingozina sunt larg răspândite în glicosfingolipidele altor ţesuturi animale, omologii C_{20} intră în constituţia gangliozidelor creierului uman; astfel 41-48% din BCL ale acestui organ constă din C_{18}- iar 34-43% din C_{20}-sfingozină.

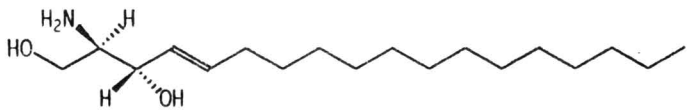
Sfingozina din ceramidele GSL posedă o lungime a catenei variabilă (14-22 atomi de C), două sau trei grupări hidroxil şi nesaturare variabilă (până la trei legături duble). Au fost sintetizaţi toţi patru izomerii posibili ai sfingozinei şi caracterizaţi prin RMN (A. Bielawska şi colab., 1993):

- *(4E,2S,3R)-2-aminooctadec-4-en-1,3-diol.*
- *(4E,2R,3S)-2-aminooctadec-4-en-1,3-diol.*
- *(4E,2R,3R)-2-aminooctadec-4-en-1,3-diol.*
- *(4E,2S,3S)-2-aminooctadec-4-en-1,3-diol.*

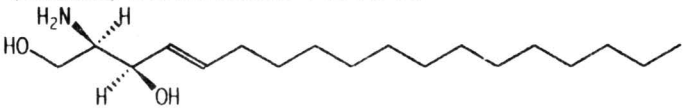
Cei patru izomeri ai Sph au următoarele structuri:



(4E,2S,3R)-2-aminooctadec-4-en-1,3-diol.

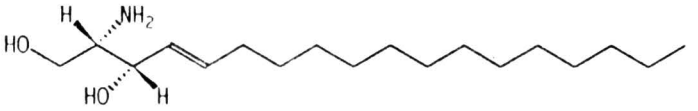


(4E,2R,3S)-2-aminooctadec-4-en-1,3-diol



(4E,2R,3R)-2-aminooctadec-4-en-1,3-diol

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



(4E,2S,3S)-2-aminooctadec-4-en-1,3-diol

Modalităţi de hidroliză a legăturii amidice a sfingozinei. Eliberarea Sph din molecula glicosfingolipidelor sau fosfosfingolipidelor condiţionează cunoaşterea compoziţiei acestora în BCL şi totodată experimentele preparative de obţinere a Sph sau a unor lizo-derivaţi: sfingozin-fosforil-colină, psihozină (ß-D-galactozil-sfingozină), psihozin sulfat, lizo-gangliozide.

Este cert că metoda enzimatică este cea mai recomandabilă datorită a cel puţin două motive:

- specificitatea reacţiei lasă nealterate celelalte legături chimice;
- nu rezultă produşi secundari cu structură foarte apropiată de a Sph şi prin urmare greu de separat de aceasta.

Metodele enzimatice de hidroliză prezintă însă, cel puţin deocamdată, un preţ de cost ridicat.

Metode chimice de hidroliză. Hidroliza chimică, de preferinţă în mediu acid, a fost utilizată iniţial pentru obţinerea Sph în stare liberă (M. A. Wells şi J. C. Dittmer, 1965; C. Long şi D. A. Staples, 1961; E. C. Gaver şi C. C. Sweeley, 1965) iar ulterior şi pentru hidroliza selectivă a legăturii amidice din compuşi cu structură complexă.

Unii autori au considerat că un sistem acid neapos este cel mai adecvat pentru hidroliza legăturii amidice a acizilor graşi din glicosfingolipide şi fosfosfingolipide; pentru aceasta compuşii respectivi au fost hidrolizaţi într-o soluţie 2N de acid sulfuric în metanol. Aceeaşi autori recomandă însă hidroliza legăturii amidice a Sph cu AG în HCl apos 6N. Prezenţa apei în mediul de hidroliză este importantă pentru evitarea formării unor derivaţi O-metil ai Sph; totodată, a fost mărit apreciabil timpul de hidroliză. Alţi autori au ales metoda de hidroliză în mediu apos care conţine şi n-butanol (W. Manheller, 1986). Prin ultima metodă de hidroliză, urmată de cromatografie pe coloană, s-a obţinut Sph pură din seria sterica D, respectiv (2S, 3R)-; puritatea fracţiilor a fost determinată prin CSS, vizualizarea fiind realizată prin stropire cu ninhidrină. Compusul a fost caracterizat şi prin analiza spectrului în IR; au fost observate următoarele benzi: 3375, 2915, 2850, 1586, 1467, 1374, 1086, 1023, 975 cm^{-1} ; reacţia cu ninhidrina a fost pozitivă atât la CSS cât şi în cazul metodei colorimetrice.

Bazele cu catenă lungă din sfingolipidele mucoasei intestinale. Sfingolipidele mamiferelor sunt eterogene în privinţa naturii BCL a acestor compuşi. Astfel, în mai multe ţesuturi a fost relatată prezenţa unor omologi ai sfingozinei, dihidrosfingozinei şi fitosfingozinei. Yurkowski şi Walker (1970) au separat cerebrozidele şi sfingomielina din mucoasa intestinală de şobolan; a urmat hidroliza cu acid clorhidric, extracţia cu cloroform-metanol şi purificarea prin cromatografie pe acid silicic. Verificarea purităţii s-a realizat prin CSS, bazele sfingozinice au fost detectate prin stropire cu soluţie de ninhidrină urmat de încalzire.

O altă caracterizare a BCL s-a realizat prin dizolvare în metanol urmat de oxidare cu metaperiodat de sodiu. Dupa adăugare de apă, aldehidele rezultate au fost extrase cu clorură de metilen şi purificate prin cromatografie pe coloană de silicagel (eluţie cu cloroform). Aldehidele purificate au fost analizate prin gaz-cromatografie; identificarea lor s-a realizat prin comparaţie cu standarde cunoscute. Detecţia compuşilor nesaturaţi s-a realizat prin hidrogenarea aldehidelor înainte de gaz-cromatografie.

În cazul sfingomielinei din mucoasa intestinală au fost obţinute două componente majore la CSS; ele aveau mobilităţi similare C_{18}-sfingozinei şi C_{18}- dihidrosfingozinei şi apăreau ca

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

spoturi duble, indicând prezența posibilă a izomerilor eritro și treo sau a unor omologi. Prezența C_{18}-sfingozinei și C_{18}-dihidrosfingozinei în sfingomielină a fost confirmată prin identificare de hexadecanal și hexadecenal în produșii de oxidare cu periodat ai BCL. Totodată, a fost detectată prezența C_{19}-dihidrosfingozinei ca component major. Cel puțin cinci alte aldehide au fost identificate în amestecul de oxidare, reprezentând baze cu diferite lungimi ale catenei inclusiv C_{19}-sfingozina.

În BCL provenite din cerebrozidele mucoasei au fost identificate mai multe componente prin CSS. Doi dintre constituenți aveau mobilități caracteristice C_{18}-dihidrosfingozinei și C_{18}-sfingozinei. Constituentul major avea mobilitate mai scazută decât dihidrosfingozina, și s-a presupus că ar putea fi C_{18}-fitosfingozina; această presupunere a fost confirmată prin gaz-cromatografie: aldehida majoră prezentă în produșii de oxidare era pentadecanal a cărui proveniență din C_{18}-fitosfingozina pare extrem de plauzibilă. Datele obținute prin cromatografie gaz-lichid au confirmat prezența C_{18}-sfingozinei și C_{18}-dihidrosfingozinei. Totodată, alături de hexadecanal și hexadecenal, a apărut, în aceeași concentrație, heptadecanal; ultimul compus ar putea proveni de la C_{19}-dihidrosfingozină sau de la C_{19}-fitosfingozină. Au fost identificate deasemenea un număr de constituenți minori. Au fost obținute deasemenea date preliminare asupra BCL cu catenă ramificată.

S-a găsit că sfingomielina din rinichi bovini conține mai multe tipuri de BCL: C_{16}-, C_{17}-, C_{18}- și C_{20}-sfingozine, C_{16}-dihidrosfingozină și C_{17}-, C_{18}- si C_{20}-fitosfingozină. În Tabelul 4 este prezentată, comparativ, compoziția în baze cu catenă lungă a sfingomielinei și cerebrozidului.

Tabelul 4.Compoziția relativă în BCL a sfingomielinei și cerebrozidului determinate prin oxidare cu periodat.

Aldehidă	Bază parentală	Concentrație (%)	
		Sfingomielină	Cerebrozid
14:0*	C16-dihidroSph	5,9	3,4
	C17-fitoSph		
14:0br	brC16-dihidroSph		2,3
15:0	C17-dihidroSph	8,8	65,1
	C18-fitoSph		
16:0	C18-dihidroSph	16,8	7,9
	C19-fitoSph		
17:0	C19-hidroSph	20,9	8,4
	C20-fitoSph		
13:1	C15-Sph	9,3	
14:1	C16-Sph	5,4	
15:1	C17-Sph		3,2
16:1	C18-Sph	21,7	6,8
17:1	C18-Sph	11,2	2,9

Spectroscopia RMN aplicată la sfingozină. Inițial spectroscopia RMN a fost aplicată la elucidarea structurii glicosfingolipidelor iar ulterior și la cercetări privind modificările

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

conformaționale ale acestora. Sfingosina utilizată pentru obținerea rezultatelor de mai jos a fost preparată prin hidroliza unui amestec brut de lipide provenite din creier uman; hidroliza s-a realizat cu un amestec constând din butanol-metanol-acid clorhidric (F. Sarmientos și colab., 1985).

Cu toate că sfingozina naturală posedă configurația 2S,3R- (D-eritro), prin hidroliză rezultă un amestec impurificat cu izomerul 2S, 3S- (L-treo). Ultimul compus rezultă printr-o inversie de configurație la atomul de carbon 3 prin intermediul unui ion de carbeniu. În plus de aceasta, mai pot rezulta produși secundari prin modificarea grupării alil, formarea unei legături metileter, izomerizare și eliminarea apei. Procedeul utilizat reduce la minimum formarea produșilor secundari (R. C. Gaver și C. C. Sweeley, 1965). În urma unor purificări repetate s-a găsit că raportul dintre 2S, 3R- (D-eritro) sfingozină și 2S, 3S- (L-treo) sfingozină este de 13:3; produșii au fost caracterizați prin spectroscopia RMN (Tabelul 5). În cazul 2S, 3R-(D-eritro) sfingozinei ordinea semnalelor RMN în spectroscopia RMN-bidimensională a rezultat dintr-o corelație CH.

Tabelul 5. Date spectroscopice pentru D-eritro și L-treo sfingozină

RMN - ^{13}C:

D-eritro-sfingozină		L-treo-sfingozină	
δ (ppm)	Ordinea	δ (ppm)	Ordinea
134,65	C-5	135,71	C-5
129,40	C-4	129,85	C-4
72,24	C-3	72,38	C-3
63,87	C-1	62,06	C-1
56,28	C-2	58,16	C-2
32,44	C-6	33,06	C-6
32,00	C-16	32,69	C-16
29,77-29,29	C-7 - C-15	30,42-29,88	C-7 - C-15
22,76	C-17	23,38	C-17
14,18	C-18	14,37	C-18

RMN - ^{1}H:

D-eritro-sfingozină		L-treo-sfingozină	
δ (ppm)	Ordinea	δ (ppm)	Ordinea
5,73	H-5	5,82	H-5
5,43	H-4	5,48	H-4
4,04	H-3	4,07	H-3
3,64	H-1	3,63	H-1
2,81	H-2	2,92	H-2
2,78	NH_2, OH	2,12	H-6
2,04	H-6	1,48-1,28	H-7 - H-17
1,40-1,23	H-7 - H-17	0,92	H-18
0,88	H-18		

Notă: spectrele RMN ale D-eritro-sfingozinei au fost înregistrate în cloroform deuterat, în timp ce spectrul L-treo-sfingozinei a fost înregistrat în $CDCl_3/CD_3OD$. De aceea în cazul spectrului izomerului L-treo nu se găsesc semnalele pentru protonii ce suferă schimb izotopic.

Pentru comparație sunt prezentate și spectrele RMN ale (2S, 3R)-N-dicloroacetil-sfingozinei în varianta RMN-^{1}H și RMN ^{13}C. Compararea spectrului RMN protonică al (2S, 3R)

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

sfingozinei cu cel al (2S, 3R)-N-dicloroacetil-sfingozinei a indicat un semnal suplimentar la 6,01ppm, care arată existența unui atom de hidrogen relativ puternic deecranat. Deplasarea apreciabilă, precum și multiplicitatea (singlet) și integrala semnalului au arătat că este vorba despre atomul de hidrogen al grupării dicloroacetil; aceasta deoarece, pe de o parte, protonul respectiv nu posedă nici un partener direct de cuplare și, pe de altă parte, cei doi atomi de clor determină, printr-un efect inductiv negativ, o deecranare puternică. În spectrul RMN-^{13}C se întâlnesc, după cum este de așteptat, două semnale suplimentare, care nu se întâlnesc în spectrul (2S, 3R) sfingozinei:

1. Semnalul de la 164,91 ppm indică o valoare a deplasării tipică pentru un atom de carbon carbonilic (gruparea CO din gruparea dicloroacetil).
2. Semnalul cu o valoare a deplasării egală cu 66,57 ppm (atomul de carbon metinic din radicalul dicloroacetil).

Semnalele sunt prezentate in Tabelul 6.

Tabelul 6. Datele RMN ale (2S, 3R)-N-dicloroacetil-sfingozinei.

RMN - ^{1}H:

δ(ppm)	Multiplicitate	Integrare	Ordinea
6,01	S	1	H-20*
5,71	DT	1	H-5
5,43	DD	1	H-4
4,16	DD	1	H-3
3,86	DD	1	H-1
3,80	M	1	H-2
3,63	DD	1	H-1
2,00	DT	1	H-6
1,12-1,32	M	**	H-7-H-17
0,85	T	3	H-18

Solvent: cloroform deuterat/metanol deuterat
S=singlet, D=dublet, T=triplet, Q=cvartet, M=multiplet
* H-20 este protonul grupării CH din dicloroacetil
** numărul de protoni nu a putut fi calculat din spectru

RMN-^{13}C:

δ(ppm)	Ordinea
164,91	C-19
134,60	C-5
128,73	C-4
72,87	C-3
66,57	C-20
60,95	C-1
55,52	C-2
32,40	C-6
32,02	C-16
29,77-29,22	C-7 - C-15
22,76	C-17
14,07	C-18

(Solvent: $CDCl_3$/CD_3OD)

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Sfingozin-1-fosfatul a fost preparat atât pe cale enzimatică cât şi prin sinteză chimică; prin hidroliza enzimatică a lizosfingomielinei, cu fosfolipaza D provenită din *Streptomyces chromofuscus*, s-a obţinut sfingozin-1-fosfat (P. P. Van Veldhoven şi colab., 1989). Precursorul căii chimice de sinteză a fost (2S, 3R, 4E) 1,3-dihidroxi 2-azido 4-octadecasfingenina (B. Kratzer şi R. R. Schmidt, 1993). Unele caracteristici fizico-chimice ale sfingozin-1-fosfatului sunt următoarele: date RMN-^{1}H: (250 mHz, CD_3COOD) δ = 0,87 (t, J=6,9 Hz, 3H, CH_3), 1,28 (m, 22H, 11CH_2), 2,04 (m, 2H, H-$6_{a,b}$), 3,67 (m, 1H, H-2), 4,24 (m, 2H, H-$1_{a,b}$), 4,46 (dd, $J_{2,3}$ = $J_{3,4}$ = 6,6 Hz, 1H, H-3), 5,49-5,58 (dd, $J_{3,4}$ = 6,6 Hz, $J_{4,5}$ = 15,3 Hz, 1H, H-4), 5,85-5,96 (dt, $J_{4,5}$ = 15,3 Hz, $J_{5,6}$ =6,4 Hz, 1H, H-5); date RMN-^{31}P: (161 MHz, CD_3COOD) δ_p=2,42; SM-FAB, m/z 380 (MH$^+$); R_F = 0,48 [n-butanol-acid acetic-apă, 3/1/1 în volume].

Cerebrozidul cu acţiune antiulceroasă, izolat din ***Tetragonia tetragonoides***, are în constituţia sa o BCL tip dien: (4E,8E)-sfingadienină şi 2-hidroxi-AG cu configuraţia R (T. Bär şi R. R. Schmidt, 1988).

Glicolipidele din rinichi uman conţin BCL cu lungimea catenei 16-20 C, inclusiv fitosfingozină (K.-A. Karlsson şi E. Martensson, 1968).

Esterii cerebrozidelor sunt larg răspândiţi în ţesutul nervos al vertebratelor, dar în cantităţi mici; hexoza este deobicei Gal dar la peştii gadoizi este Glc. Poziţia legăturii acil ester pe Gal variază cu specia animală: poziţia 6 la creierul de suine (Y. Kishimoto şi colab., 1968), 3 si 6 la creierul de bovine (Y. Tamai, 1968), 2, 3, 4 şi 6 la creierul de balenă, de om şi de bovine (Y. Yasugi şi colab., 1982, 1983).

Acizii graşi (AG) variază ca lungime a catenei (14-35 atomi de C), ca poziţie a hidroxilării (2D-hidroxi sau ω-hidroxi) şi ca nesaturare (1-6 legături duble *cis*). Cerebrozidul izolat din *Tetragonia tetragonoides* are în constituţia sa 2-hidroxi-AG cu configuraţia R (T. Bär şi R. R. Schmidt, 1988).

Tabelul 7 şi Tabelul 8 prezintă compoziţia în BCL şi respectiv AG a gangliozidelor din rinichi şi splină de cal.

Tabelul 7.Compoziţia în baze cu catenă lungă a gangliozidelor din rinichi şi splină de cal (exprimată procentual pentru fiecare tip de gangliozid).

BCL	Rinichi					Splina				
	GM3	GM2	GM1a	GD3	GD1a	GM3	GM2	GM1a	GD1a	GD1b
t16:0	0,7	1,0	1,7	0,8	1,8	ND	1,6	0,8	0,6	1,9
d16:0	4,8	3,2	5,2	6,2	4,6	4,9	4,7	2,3	3,1	2,8
d16:1	1,1	0,8	10,3	2,8	4,9	6,8	4,7	8,4	5,3	10,3
t18:0	29,6	41,0	50,0	28,6	44,0	44,9	33,9	42,9	27,8	35,8
t18:1	1,9	3,5	6,9	8,8	2,9	3,4	3,9	6,0	4,0	2,1
d18:0	12,5	10,1	9,5	10.8	8,6	7,3	5,9	5,1	6,8	8,9
d18:1	33.5	29,7	11,2	28,8	21,6	17,1	36,3	26,0	33, 0	28,6
t20:0	11,7	3,8	1,7	1,0	1,8	ND	ND	ND	1,3	0,1
t20:1	1,4	2,0	0,9	3,3	3,0	6,8	4,7	3,0	8,8	6,3
d20:0	ND	0,1	2,6	4,9	ND	8,8	3,9	5,3	4,8	2,8
d20:1	2,8	1,8	ND	4,0	0,5	ND	ND	ND	3,5	0,4
BCL Tri-hidroxi	45,3	51,3	61,2	42,3	59,8	55,1	44.1	52,7	42,5	45,2

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Abrevieri: BCL, bază cu catenă lungă; d şi t, bază cu catenă lungă dihidroxi- şi respectiv trihidroxi; ND, nedetectată.

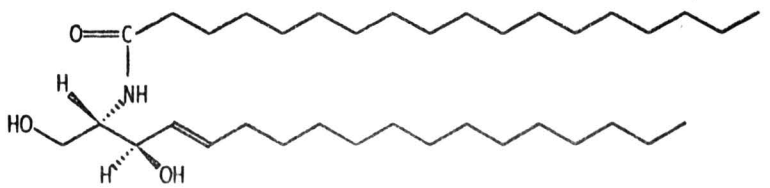
Tabelul 8. Compoziţia în acizi graşi a gangliozidelor din rinichi şi splină de cal (%).

Acid gras	Rinichi					Splină				
	GM3	GM2	GM1a	GD3	GD1a	GM3	GM2	GM1a	GD1a	GD1b
16:0	8,8	6,1	15,4	17,3	19,0	10,0	9,8	4,9	9,2	4,5
16:0h	1,6	ur	ur	ur	0	1,0	ur	8,4	1,5	4,9
18:0	17,3	17,5	8,9	6,8	13,5	7,4	10,9	14,1	11,2	4,7
18:0h	ur	5,6	ur	ur	1,3	4,5	ur	1,7	1,1	2,8
19:0	ur	2,4	4,3	1,0	2,2	7,1	5,2	8,1	6,6	7,6
20:0	8,8	5,2	5,0	8,8	4,4	6,4	7,9	4,6	7,1	8,0
20:0h	2,6	1,1	ur	ur	0	0	0	ur	2,3	0
21:0	ur	1,3	4,6	1,3	ur	6,1	3,1	6,1	7,0	6,1
22:0	8,3	8,6	10,3	12,4	11,8	6,5	7,8	6,4	5,7	1,4
22:1	ur	ur	1,0	ur	ur	2,4	1,8	ur	0	2,2
22:0h	6,0	3,4	ur	ur	0	0	0	1,3	0	0
23:0	4,3	2,3	ur	6,2	1,6	2,3	5,9	4,1	9,4	4,7
24:0	16,8	21,9	27,7	37,3	40,3	25,0	26,1	15,2	7,7	7,6
24:0	2,6	2,1	ur	ur	ur	3,8	3,8	4,5	5,6	7,6
24:0h	ur	4,5	1,2	1,2	ur	8,1	6,2	3,8	1,6	4,3
25:0	6,0	2,9	3,4	1,4	1,2	6,3	3,2	7,6	8,7	11,4
26:0	4,2	ur	ur	1,1	ur	1,5	5,5	2,6	2,7	10,4
NI	9,7	12,4	12,6	2,2	ur	1,6	1,8	4,8	13,6	11,8
AGM	3,5	2,7	1,7	0,6	2,1	6,2	5,6	5,0	5,6	7,6
AGH	12,0	15,1	3,6	3,5	1,5	13,5	7,3	15,7	6,5	12,0

Abrevieri: NI, AG neidentificaţi; AGM, acizi graşi mono-nesaturaţi; AGH şi h, acid gras 2-hidroxilat.

Esterul cu AG al cerebrozidului a fost găsit în sistemul nervos al peştilor gadoizi. Astfel din ţesutul nervos al peştelui din Alaska, *Theragra chalcogramma,* au fost izolaţi şapte esteri cu următoarea structură: 6-O-acil-ß-D-galactopiranozil-, 6-O-acil-ß-D-glucopiranozil-, 2-O-acil-galactozil-, 2-O-acil-glucozil-, 3- sau 4-O-acil-galactozil- şi 3-O-acil-glucozil-ceramid, izomerii 6-O-acil şi 2-O-acil fiind predominanţi (Y. Tamai şi colab., 1993).

Ceramidul conţinând acid stearic şi BCL cea mai cunoscută are următoarea structură:

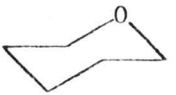


Ceramid (N-acil gras sfingozină)

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

1.2.Glucidele neutre.

După cum se observă din Tabelul 1, glucidele neutre prezente în glicolipide sunt: galactoza (Gal), glucoza (Glc), N-acetil-galactozamina (GalNAc), N-acetil-glucozamina (GlcNAc), L-fucoza (Fuc), manoza (Man), xiloza, arabinoza (Ara). Glucidele neutre aparţin de regulă seriei sterice D, cu excepţia fucozei care aparţine seriei sterice L. (L-Fucoza este L-6-deoxi-galactoză). De regulă glucidele neutre se găsesc, în constituţia glicolipidelor, ca inel piranozic de tipul $^4C_1$:



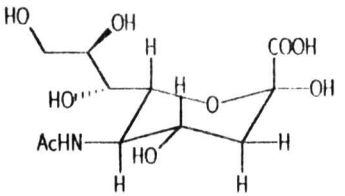
inel piranozic de tipul $^4C_1$

O excepţie notabilă de la această regulă o constituie, pentru anumiţi compuşi, galactoza. Galactofuranoza (Gal f) a fost găsită în cadrul unor structuri tip ancoră, ca de ex glicoinozitol-fosfolipidul (GIPL) având un glicerolipid sau un ceramid, ca de ex în lipopeptidofosfoglican (LPPG) din *Trypanosoma cruzi*, în miezul oligozaharidic al lipofosfoglicanului (LPG) din speciile de *Leishmania* şi în catenele bogate în manoză din cadrul glicoproteinelor de la tripanosomatide (R. M. de Lederkremer şi W. Colli, 1995). Galf se leagă deobicei ß1-3 la Man, fie ca unitate terminală nereducătoare, ca de ex unităţile nereducătoare terminale (de ex în LPPG), sau în mijlocul miezului oligozaharidic (de ex în LPG). Prezenţa, la protozoarele parazite, a Gal în configuratie furanozică este o particularitate importantă deoarece mamiferele gazdă nu par să producă glicoconjugate care conţin această unitate structurală. Din acest motiv, organismul gazdă produce anticorpi faţă de galactofuranoză, ceea ce completează înţelegerea patogenezei şi contribuie la dezvoltarea metodelor de diagnoză.

În GSL a nevertebratelor au fost găsite glucide metilate: 3-O-metilxiloză, 3-O-metilgalactozamină, 3-O-metilfucoză, 3-O-metil-galactoză, acid 4-O-metilglucuronic; deasemenea au fost găsiţi derivaţi 4-O-metilaţi ai galactozei, glucozaminei şi acidului glucuronic (M. Sugita şi colab., 1984).

1.3.Fracţiunea acidă

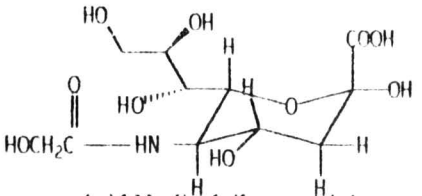
1.3.1.Acidul sialic (AS) cel mai frecvent întâlnit în constituţia GSL este acidul N-acetilneuraminic (acid 5-acetamido-3,5-dideoxi-D-glicero-α-D-galacto-nonulopiranozic; NANA, NeuAc, NeuNAc, Neu5Ac) (W. Pigman, 1977,1978):



Acid N-acetil neuraminic

Un AS mai polar este acidul N-glicoloilneuraminic (NGc, NGNA); gangliozidele din rinichi şi splină de cal conţin cantităţi apreciabile de NGNA (S. Gasa şi A. Makita, 1980):

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



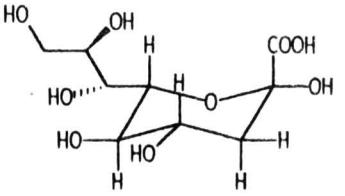
Acid N-glicoloil neuraminic

Raportul molar dintre cei doi acizi este prezentat în (Tabelul 9). Analizând NGc din gangliozidele laptelui bovin în funcţie de stadiul lactaţiei, s-a găsit că colostrul conţine cea mai ridicată concentraţie de NGc (21-22 % din conţinutul total al AS din gangliozide (R. Puente şi P. Hueso, 1993).

Tabelul 9. Conţinutul în gangliozide a rinichiului şi splinei de cabaline şi proporţia de NANA şi NGNA în gangliozide.

Sursă, Gangliozide	Concentraţie (mg/kg ţesut)	Acid sialic (procente	
		NANA	NGNA
Rinichi			
GM3	25,0	64	36
GM2	0,4	60	40
GM1a	0,1	12	86
GD3	0,9	7	93
GD1a	0,2	29	71
Splină			
GM3	19,0	33	67
GM2	1,5	32	68
GM1a	1,5	17	83
GD1a	1,3	5	95
GD1b	0,6	24	76

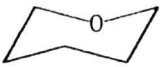
În ţesutul testicular de păstrăv curcubeu, *Oncorhynchus mykiss*, iar ulterior şi în alte surse, au fost găsite glicoconjugate, glicoproteine şi gangliozide, care conţin un acid sialic la care în loc de gruparea acetamido se găseşte o grupare hidroxil; AS respectiv a fost denumit KDN (acid 2-ceto-3-deoxi-D-glicero-D-galacto-nononic) (Y. Song şi colab., 1995):



KDN

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Se observă că toate cele trei tipuri de AS (precum şi L-fucoza) se găsesc în conformaţia $_4C^1$:



Inel piranozic în conformaţia $_4C^1$

Diferenţierea între diferite tipuri de AS se realizează prin mai multe tehnici: SM-BAR, RMN, anticorpi monoclonali. Variaţia gradului de acetilare a AS a fost constatată atât la gangliozidele din seria lactoză cât şi la gangliozidele din seria gangliotetraoză. Din creier de şoarece a fost izolat gangliozidul GT1b acetilat pe un rest de AS în poziţia 9 (Neu5Acα2-3Galß1-3GalNAcß1-4(9-O-Ac-Neu5Acα2-8Neu5Acα2-3)Galß1-4Glcß1-1'Cer)(R. Ghidoni şi colab., 1980). Gangliozidul GM3 conţinând fie NANA fie NGNA a fost izolat din intestin de şobolan (M. Iwamori şi colab., 1984) şi din creier de viţel (S. Sonnino şi colab., 1990). Gangliozide GD3, precum şi gangliozide din seria Gg4 (GT1b) conţinând NGNA au fost găsite şi în medulara suprarenalei bovine (T. Ariga şi colab., 1983). Prin utilizarea fracţiunii microzomale din ficat de cabaline s-a obţinut, prin biosinteză, acid 9-O-lactoil-N-acetilneuraminic (R. G. Kleinedam şi colab., 1993). Din lapte bovin au fost purificate şi caracterizate gangliozide al căror AS a prezentat următoarele modificări biochimice: pentru gangliozidul GD3: 7,9-di-O-Ac-Neu5Ac, 7-O-Ac-Neu5Ac, 9-O-Ac-Neu5Ac; pentru gangliozidul GT3: Ac-O-Neu5Ac. În toate cazurile acetilarea s-a realizat pe AS terminal (S. Ren şi colab., 1992). În eriterocite de cabaline a fost găsit gangliozidul GM3 conţinând 9-O-Ac NGNA (Y. Yachida şi colab., 1996). Miezul lipopolizaharidului de la *Legionella pneumophila* de serogrup 1 conţine acid 3-deoxi-D-mano-octulosonic (Kdo) (H. Moll şi colab., 1997). Caracterul anionic al lipopeptidofosfoglicanului (LPPG) din epimastigot de *Trypanosoma cruzi* este conferit de secvenţa inozitol-1-fosfat-ceramid şi de restul aminoetilfosfonat (AEP) legat printr-o legătură ester fosfonat la C-6 al glucozaminei (R. M. deLederkremer şi colab., 1991). Ancora proteică GPI a proteazei de suprafaţă de la promastigotul *Leishmania major* are sarcina negativă distribuită pe secvenţa inozitol-1-fosfat-gliceroIipid şi pe secvenţa etanolamină-fosfat-6-Man (P. Schneider şi colab., 1990). Caracterul acid al glicosfingolipidului de la *Neanthes diversicolor* este determinat de către un rest fosfodiester situtat între colină şi C-6 al D-Gal (N. Noda şi colab., 1993). Gangliozidul GM4 din testicul de cocoş conţine atât Neu5Ac cât şi Neu5Gc (D. P. Iga şi colab., 1998). AS terminal al gangliozidului GD3 din melanoma umană este $Neu5,9Ac_2$ (J. Thurin şi colab., 1985). Gangliozidele fucozilate din seria neolacto provenite din granulocite umane normale conţin îndeosebi Neu5Ac (J. Müthing şi colab., 1996). Un gangliozid din melanoma de hamster are structura următoare: Ac-O-7Neu5Acα2-8Neu5Acα2- 3Galβ1-4Glcβ1-1'Cer (S. Ren şi colab., 1993). Studiul interrelaţiilor cinetice şi spaţiale dintregangliozid glicoziltransferaze şi O-acetiltransferaze în celule de melanoma umană a dus la următoarele concluzii: cu toate că acetatul marcat poate fi transferat direct de la acetil-CoA la GD2, activitatea gangliozid O-acetiltransferazică nu se suprapune în mod substanţial cu compartimentul biosintetic al lui GD2. În mod contrar, O-Ac-GD3 pare a fi colocalizat cu compartimentul biosintezei GD2 şi serveşte ca acceptor pentru GD2 sintază. Astfel, atât 9-O-Ac-GD3 cât şi GD2 pot fi precursori ai 9-O-Ac-GD2, dar în compartimente diferite (E. R. Sjoberg şi A. Varki, 1993). Gangliozidele ramificate, cu structură de tip sialil-Le^a, din adenocarcinom rectal uman conţin exclusiv Neu5Ac (H. Kitagawa şi colab., 1993). GSL acide din melcii de mare *Turbo cornutus*, *Monodonta labio* şi *Chlorostoma argyrostoma turbinatum* îşi datorează sarcina negativă metilaminoetilfosfonatului legat la C-6 al D-Gal (F. Matsuura, 1979; A. Hayashi şi T. Matsubara, 1989). GSL acide de la "iepurele de mare" *Aplysia kurodai* au o sarcină negativă netă datorată fie mai multor resturi de aminoetilfosfonat legate în mod constant pe C-6 a Gal, fie acetalizării cu acid piruvic (pe C-3 şi

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

C-4 a unui rest Gal) şi mai multor legături ester cu aminoetilfosfonat pe C-6 a altor resturi D-Gal (S. Araki şi colab., 1989). Gangliozidele Echinodermelor prezintă proprietăţi structurale excepţionale şi datorită varietăţilor moleculare de AS. Astfel NeuGc8Me a fost găsit la *Asterina pectinifera* (M. Sugita, 1979), la *Asterias amurensis* (N. K. Kochetkov şi colab., 1980), *Aphelasterias japonica* (G. P. Smirnova şi colab., 1987). În gangliozidele hepatopancreasului de la *Evasterias retifera* a fost găsită secvenţa NeuAcα2-9NeuAcα2-3GalNAcβ1-3Galβ1- (N. K. Kochetkov şi colab., 1982). Un monosialogangliozid din gonade de *Echinocardium cordatum* conţine NGNA sulfatat la C-8 (N. K.Kochetkov şi colab., 1976).

Unitatea disialosil are structura indicată în Fig. 2 (atomii de hidrogen au fost omişi):

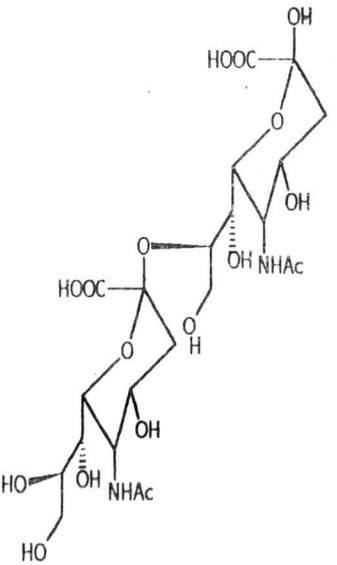


Fig.2.Unitate disialosil constitutivă a gangliozidelor.

3.2. Sulfatul. În marea majoritate a cazurilor, sulful se găseşte în GSL ca ester sulfat (v. mai departe). Se cunosc puţine excepţii de la această regulă; sulfolipidul (6-sulfo-α-D-quinovopiranozil-(1-1')-2',3'-di-O-acil-D-glicerol) este un glicolipid caracteristic al plantelor. Din cianobacteriile genului *Synechococcus* a fost separat şi caracterizat un GSL care conţine sulf în două stări de oxidare diferite: sulfonat şi sulfură; compusul a fost denumit tionsulfolipid şi are structura următoare: 6-sulfo-α-D-quinovopiranozil(1-1')-2'-O-acil-3'-O-tioacil-D-glicerol (K. Kaya şi colab., 1993).

3.3.Acidul glucuronic. Se cunosc atât GSL cât şi glicoglicerolipide care conţin acid glucuronic (GlcA) legat printr-o legatură ß, ca fragment glicozidic sau 3-sulfoglicozidic (E. Borroni şi colab., 1989; P. Fredman şi colab., 1993). În GSL a nevertebratelor a fost găsit acid 4-O-metilglucuronic (M. Sugita şi colab., 1984). Din *Pseudomonas rubescens* a fost purificat şi caracterizat un glicoglicerolipid pe bază de acid glucuronic, 1-O-monoglucuronosil-diglicerid (S. G. Wilkinson, 1968).

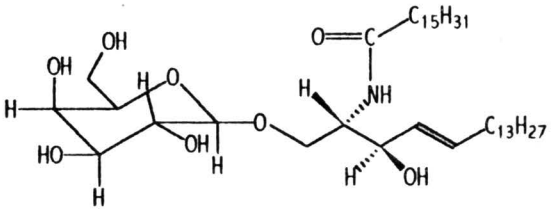
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

2.Glicolipide ale cordatelor

Dintre glicolipidele animalelor superioare, cele mai numeroase studii s-au realizat pe gangliozide şi pe constituenţii acestora.

2.1.Monohexozil-ceramide

Cele mai studiate monohexozil-ceramide sunt glucozil-ceramidele (GlcCer) şi galactozil-ceramidele (GalCer). Ambele sunt foarte răspândite ca atare sau în constituţia unor substanţe cu structură mai complicată. Astfel GlcCer intră în constituţia GSL din următoarele serii: ganglio, neolacto, globo,izoglobo, lacto, muco, arthro, mollu, schisto. GalCer intră în constituţia GSL din seria gala precum şi a gangliozidului GM4 (NeuAcα2-3Galß1-1'Cer) şi a cerebrozid-sulfatului (a se vedea GSL sulfatate). GalCer (galactocerebrozidul) are următoarea structură:

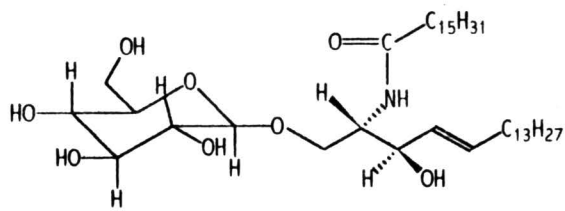


Galactozil-ceramid (galactocerebrozid)

Glucocerebrozidul. Iată câteva caracteristici ale GlcCer izolat din ser uman normal. Compusul este nereducător, prin urmare glucidul este legat glicozidic la Cer. Cromatografia pe hârtie şi electroforeza în tampon borat au arătat prezenţa glucozei; conţinutul în hexoză era următorul: 19,7% (orcinol), 20,3% (antronă); metoda cu glucozo-oxidază a dat o concentraţie de glucoză egală cu 18,9%. Procentul de azot găsit a fost de 1,78%; raportul molar N/hexoza, 1:1. In constituţia GlcCer au fost găsiţi atât AGN cât şi 2-hidroxi-AG. Unghiul de rotaţie specifică a GlcCer avea valoarea:

$$[\alpha]_D^{20} = -6,4^\circ \text{ (c=2,2\% în piridină)}$$

Spectrul IR era similar celui descris pentru cerebrozidele Gaucher (GlcCer, a se vedea Catabolismul gangliozidelor). Makita şi Yamakawa (1962) au demonstrat că cerebrozidele splinei normale conţin numai glucoză. Cerebrozidele serului şi ficatului conţin deasemenea exclusiv Glc (E. Svennerholm şi L. Svennerholm, 1963):



Glucocerebrozid (GlcCer)

Mai multe glucocerebrozide cu activitate antiulceroasă, care fuseseră izolate anterior din *Tetragonia tetragonoides*, au fost sintetizate prin metodele chimiei organice; iată cîteva caracteristici ^{1}H-RMN ale acestora (în hexadeutero-DMSO la 250 MHz). Pentru (2S,3R,4E,8E)-

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

1-(ß-D-Glucopiranosiloxi)-2-[(2R)-2-hidroxi-hexadecanoilamino]-4,8-octadecadien-3-ol: δ 7,38 (d, 1H, NH, J 8,9 Hz), 5,68-5,48 (m, 2H, OH, 5-H), 5,42-5,30 (m, 3H, 4-H, 8-H, 9-H), 4,98-4,88 (m, 4H, 4OH), 4,51 (t, 1H, OH, J 5,8 Hz), 4,15-2,92 (m, 12H, 1-H_a, 1-H_b, 2H, 3H, 1'-H, 2'-H, 3'-H, 4'-H, 5'-H, 6'-H_a, 6'-H_b, 2''-H), 2,02-1,88 (m, 6H, 6-H_a, 6-H_b, 7-H_a, 7-H_b, 10-H_a, 10-H_b), 1,35-1,15 (m, 40H, CH_2), 0,85 (t, 6H, $2CH_3$, J 6,3 Hz). Pentru (2S,3R,4E,8E)-1-(ß-D-Glucopiranosiloxi)-2-[(2S)-2-hidroxi-hexadecanoilamino]-4,8-octadecadien-3-ol: δ 7,9 (d, 1H, NH, J=8,2 Hz), 5,68-5,55 (m, 1H, 5-H), 5,46-5,27 (m, 4H, OH, 4-H, 8-H, 9-H), 4,97-4,88 (m, 4H, OH), 4,49 (t, 1H, OH, J=5,8 Hz), 4,11-2,90 (m, 12H, 1-H_a, 1-H_b, 2H, 3H, 1'-H, 2'-H, 3'-H, 4'-H, 5'-H, 6'-H_a, 6'-H_b, 2''-H), 2,08-1,88 (m, 6H, 6-H_a, 6-H_b, 7-H_a, 7-H_b, 10-H_a, 10-H_b), 1,38-1,16 (m, 40H, CH_2), 0,85 (t, 6H, $2CH_3$, J=6,3 Hz) (T. Bär şi R. R. Schmidt, 1988).

Notă. Atomii de carbon ai Sph sunt numerotaţi cu cifre arabe normale, atomii de C ai glucozei cu numere prime, atomii de C ai AG cu numere secunde.

Un alt glucocerebrozid, (2S,3R,4E,8Z,2'R)-1-O-(ß-D-glucopiranozil)-N-(2'-hidroxidecanoil)-4,8-sfingadienină, cu activitate antiulceroasă, izolat iniţial din *Tetragonia tetragonoides*, a fost sintetizat de către S. Kodato şi colab., (1989). Iată câteva caracteristici fizice ale compusului. $[\alpha]_D^{20}$ +4,6° (c=1,76, cloroform-metanol 1:1, în vol. Recristalizarea din MeOH-H_2O a dat un solid cu p.t. 183 °C. IR 3400br, 3000, 2960sh, 2920, 2850, 1645, 1530, 1460, 1430, 1375, 1310br, 1260sh, 1160, 1075, 1040sh, 890, 720; SM-FAB (MH^+), 696, 534, 280, 262. RMN-^{1}H (400 MHz) ($CDCl_3$ – CD_3OD, 30:25, în vol.): 0,89 (6H, t, J=6,9 Hz, C18-H şi C16'-H), 1,27 (36H, m de tip s), 1,42 (2H, m, C11-H Ă C17-H şi C4'-H Ă C15'-H), 1,57 (1H, m), 1,75 (1H, m), 2,02 (2H, q, J=6,6 Hz), 2,11 (4H, m, C6-H, C7-H, C10-H şi C3'-H), 3,24 (1H, t, J=8,5 Hz, H-2, H-3 sau H-4), 3,31 (1H, m, H-5), 3,41 (2H, t, J=8,5 Hz, H-2, H-3 sau H-4), 3,72 (1H, dd, J=12,0, 5,4 Hz, H-6), 3,75 (1H, dd, J=10,1, 3,2 Hz, C1-H), 3,87 (1H, dd, J=12,1, 2,4 Hz, H-6), 4,02 (2H, m tip dd, C2-H şi C2'-H), 4,08 (1H, dd, J=10,1, 5,7 Hz, C1-H), 4,14 (1H, t, J=7,3 Hz, C3-H), 4,28 (1H, d, J=7,8 Hz, H-1), 5,36 (2H, m, C8-H şi C9-H), 5,49 (1H, dd, J=15,4, 7,2 Hz, C4-H), 5,75 (1H, dt, J=15,4, 6,7 Hz, C5-H). Aceeaşi autori au elaborat spectrul RMN-^{1}H a glucocerebrozidului de mai sus în piridină pentadeuterată şi în DMSO-hexadeuterat, înregistrând schimbările ce au apărut prin adăugare de D_2O (S. Kodato şi colab., 1989).

2.2. Dihexozil-ceramide

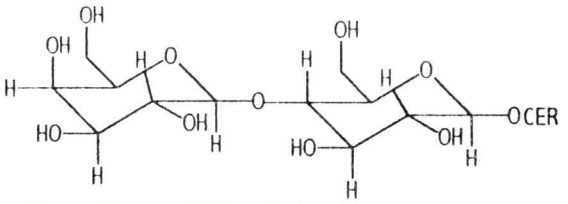
Cele mai importante dihexozil-ceramide sunt lactozil-ceramidul (LacCer; Galß1-4Glcß1-1'Cer) şi galabiozil-ceramidul (Galα1-4Galß1-1'Cer).

Lactozil-ceramidul. LacCer izolat din ser uman normal avea următoarele caracteristici. Cromatografia pe hârtie, pe de o parte, şi electroforeza în tampon borat, pe de altă parte, a dovedit că hexozele prezente sunt Gal şi Glc. Conţinutul în hexoze, determinat cu un amestec echimolecular de Gal şi Glc ca standard, era de 38,3%. Metoda cu glucozo-oxidază a arătat că procentul de Glc era de 16,4%; s-a găsit un procent de azot de 1,50%. Raportul molar N/hexoza era de 1:2. Unghiul de rotaţie optică avea valoarea:

$$[\alpha]_D^{20} = -8,6° \text{ (c=3,0\% în piridină)}$$

Compusul era transformat în GlcCer şi Gal, prin hidroliză acidă menajată (E. Svennerholm şi L. Svennerholm, 1963). LacCer a mai fost izolat din ficat şi splină; compusul este extrem de asemănător cu citolipina H izolată din ţesut tumoral uman şi splină bovină normală (Rapport şi colab., 1959, 1960) precum şi cu ceramid dihexozidele izolate din splina mai multor specii (Makita şi Yamakawa, 1962). Structura LacCer este următoarea:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



Lactozil-ceramid (LacCer)

(A se vedea, pentru o caracterizare structurală mai completă a mono- şi dihexozil-ceramidelor, metodele de elucidare a structurii GSL şi sulfo-GSL).

2.3.Gangliozide

Gangliozidele sunt glicosfingolipide conţinând în molecula lor acid sialic (N-acetilneuraminic, NeuAc, NANA) (R. W. Ledeen şi R. K. Yu, 1982). Gangliozidele se clasifică, conform structurii lor asialo-carbohidrat, în şase tipuri (M. Iwamori şi colab 1984): galactoză (gangliozidul GM4), lactoză (GM3, GD3, GT3, etc.), ganglio-N-triaoză (GM2), ganglio-N-tetraoză (GM1a, GM1b, GD1a, GD1b, GD1c, GT1b, etc) globo-N-tetraoză (sialosil-paraglobozidul 2-3 şi 2-6) şi lacto-N-neotetraoză (sialosil Lewis X). În lucrarea de faţă ne vom ocupa îndeosebi de tipul ganglio-N-tetraoză.

2.3.1.Elucidarea structurii gangliozidului GM1a

Un moment important din cursul elucidării structurii glicosfingolipidelor l-a constituit clarificarea structurii gangliozidului GM1a de către Kuhn şi Wiegandt (1963). Cu toate că între timp metodele fizice şi chimice legate de cunoaşterea structurii au progresat mult lucrarea lui Kuhn şi Wiegandt rămâne un model remarcabil.

Produşii hidrolizei totale ai gangliozidului GM1a sunt: acid sialic, galactoză, N-acetilgalactozamină, glucoză, sfingozină, acid gras, în raport molar 1:2:1:1:1:1. Acidul sialic nu este detaşat de către sialidaza din vibrionii holerei nici chiar la timpi de incubare lungi şi la concentraţii mari de enzimă.

Hidroliza acidă parţială. Prin încălzirea cu acizi minerali diluaţi (de ex. acid sulfuric N/100) gangliozidul GM1a pierde acidul sialic şi rezultă un asialo-gangliozid care conţine, alături de acidul gras şi sfingozină, cele patru molecule de glucide neutre.

Cu acizi mai concentraţi (de ex. acid sulfuric N/10 la 100 °C) sfingozina este detaşată, în amestec fiind identificate patru fragmente oligoglucidice, dintre care două sunt dizaharide. Unul dintre dizaharide este lactoza ($(\alpha)^{24}_D$ +53,6° în apă; este hidrolizată de către ß-galactozidază la glucoză şi galactoză). Cel de-al doilea dizaharid , ganglio-N-bioza I, cristalizează din metanol apos ca ace radiare, $(\alpha)^{24}_D$+ 24° (în apă), dă prin hidroliză acidă galactoză şi galactozamină.

Structura ganglio-N-biozei I . Structura Gal-GalNAc-, cu gruparea reducătoare la aminoglucid, este susţinută de următoarele argumente:

a) Dizaharidul este hidrolizat, chiar dacă viteza de reacţie este mai mică decât în cazul lactozei, de către ß-galactozidază; rezultă galactoză si N-acetil-galactozamină.

b) Dupa hidrogenarea dizaharidului cu $NaBH_4$ urmată de hidroliza acidă se identifică un singur compus care dă reacţie anilinftalat pozitivă şi anume galactoza.

c) Supunând dizaharidul la acţiunea alcaliilor diluate, la temperatura camerei, se formează cromogenul N-acetil-galactozaminei concomitent cu distrugerea acesteia; ulterior, numai

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

galactoza mai poate fi evidențiată prin reacția cu anilinftalat. În felul acesta este exclusă structura GalNAc-Gal-.

În ce privește poziția de legare, aceasta este susținută de următoarele date:

d) Prin oxidarea cu periodat a ganglio-N-biozei I , N-acetil-galactozamina nu este afectată; aceasta exclude eventualitatea legării galactozei la galactozamină în pozițiile 5 sau 6.

e) Reacția Elson-Morgan a dizaharidului este pozitivă chiar la rece, producându-se cromogenul liber (dar nu galactozido-cromogen); când galactoza se leagă în poziția 6 formarea galactozido-cromogenului are loc numai la cald; în cazul legării galactozei la poziția 4, reacția Morgan-Elson este absentă. Restul de galactoză se leagă prin urmare în poziția 3 a GalNAc, fapt în concordanță cu labilitatea la alcalii indicată la punctul c).

Ganglio-N-bioza I formează un cromogen cu soluția de $K_2B_4O_7$ la 100°C. Lacto-N-tetraoza, ganglio-N-tetraoza, lacto-N-triaoza I și II și ganglio-N-bioza II (v. mai jos) nu dau această reacție (cu toate că după încălzire cu o soluție de Na_2CO_3 dau reacție de culoare cu aldehida Ehrlich). Cu $K_2B_4O_7$ dau cromogeni următorii compuși: N-acetil-glucozamina, N-acetil-galactozamina, precum și oligozaharidele care conțin aceste acetilaminoglucide, obligatoriu nesubstituite în poziția 4, la capătul reducător : Gal1-6GlcNAc, lacto-N-bioza I, ganglio-N-bioza I. De aici, precum și din hidroliza cu ß-galactozidază, precum și din unghiul de rotație mic ($(\alpha)_D$ +24) urmează că ganglio-N-bioza I este un ß-dizaharid cu structura următoare: Galß1-3GalNAc-.

α-Dizaharidul corespunzător a fost evidențiat ca produs de hidroliză a substanțelor implicate în existența grupelor sanguine. Acest compus s-a dovedit identic cu ß-dizaharidul obținut din gangliozide numai în privința comportării față de alcalii, a reacției cu $K_2B_4O_7$ și a vitezei de migrare la cromatografie.

Formarea de Galß1-3GalNAc- (ganglio-N-bioza I) și de Galß1-4Glc- (lactoză), prin hidroliză acidă parțială, dovedește că ambele resturi de galactoză sunt integrate în structura gangliozidelor. Unul și același rest de galactoză nu poate constitui o structură pentru ambele dizaharide. Existența a doi moli de galactoză a fost confirmată prin hidroliză parțială. Modul de legare al ganglio-N-biozei I cu lactoza, pentru a forma ganglio-N-tetraoză a rezultat deasemenea din experimente degradative.

Prin metodele indicate mai sus a fost clarificată și structura celorlalte oligozaharide obținute din gangliozidul GM1a (Tab. 10).

Tabelul 10.Oligozaharide obținute din gangliozidul GM1a.

Oligozaharid	Formulă	$(\alpha)_D$
Ganglio-N-tetraoză	Galß1-3GalNAcß1-4Galß1-4Glc-	+13,9
Ganglio-N-triaoza I	Galß1-3GalNAcß1-4Gal-	+12
Ganglio-N-triaoza II	GalNAcß1-4Galß1-4Glc-	+17
Ganglio-N-bioza I	Galß1-3GalNAc-	+24
Ganglio-N-bioza II	GalNAcß1-4Gal-	
Lactoză	Galß1-4Glc	+54

Clivarea gangliozidelor cu neuraminidază. Din creier uman și din creier bovin (R. Kuhn și colab., 1961; R. Kuhn și H. Wiegandt 1963) au fost purificate șase gangliozide, desemnate ulterior GM2, GM1a, GD1a, GD1b, GT1b, GQ1b (L. Svennerholm, 1963). Gangliozidul GM2, spre deosebire de celelalte, se găsește în concentrație mult mai mică, practic în urme; pe de altă parte, glucidele

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

neutre se găsesc în acest gangliozid în raportul molar 1:1:1 (Gal-Glc-GalNAc). Deosebirea dintre gangliozidele de mai sus constă în numărul şi respectiv poziţia de legare a acidului sialic. Determinările analitice au arătat că gangliodele GD1a şi GD1b sunt izomere, ele conţinând două resturi de acid sialic .

La pH uşor acid gangliozidele GD1a, GD1b, GT1b şi GQ1b sunt hidrolizate de către sialidaza din vibrionii holerei la acid sialic şi gangliozidul GM1a; ultimul rămâne neschimbat sub acţiunea acestei enzime chiar la concentraţii înalte de enzimă. Studiile cinetice au arătat că la hidroliza enzimatică a lui GQ1b rezultă, alături de acidul sialic, GT1b care la rândul lui este clivat la acid sialic şi GD1b; gangliozidul GD1b este clivat mai departe la acid sialic şi GM1a. În aceste experimente găsirea lui GD1a ca intermediar nu a putut fi dovedită. Gangliozidele GT1b şi GQ1b derivă prin urmare din GD1b. În gangliozidul GD1a poziţia celui de-al doilea rest de acid sialic este în mod evident alta decât în GD1b. Transformările de mai sus au fost rezumate în următoarea schemă:

GD1a → GM1a ← GD1b ← GT1b ← GQ1b

Acţiunea sialidazei asupra oligozaharidelor care conţin acid sialic, oligozaharide ce rezultă prin acetoliza gangliozidelor (v. mai jos), prezintă un tablou analog al reacţiilor de transformare.

Acetoliza. Prin hidroliza gangliozidelor cu un amestec de acid acetic-anhidridă acetică-acid sulfuric concentrat, acidul sialic ete înderpărtat numai parţial, astfel că rezultă oligozaharide care conţin acid sialic (R. Kuhn şi H. Wiegandt, 1963). Cu acizi minerali diluaţi este clivat restul de acid sialic, astfel că se pot obţine oligozaharidele libere corespunzătoare; printre acestea tetrazaharidul intact numit, prin analogie cu lacto-N-tetraoza, ganglio-N-tetraoză, precum şi produşi de hidroliză suplimentari printre care compuşi în care legătura dintre lactoză şi ganglio-N-bioza I este intactă.

Glucidele şi oligozaharidele conţinând acid sialic sunt prezentate în Tabelul 11.

Tabelul 11.Sialosil-oligozaharide rezultate din gangliozidele GM1a, GD1a, GD1b, GT1b.

Compus	Scindare cu sialidază	Oxidarea cu periodat (Produşi)
AS2-3Gal	++++	Lixoza
AS-Ganglio-N-bioza II	(-)	
AS2-3Lactoza	+++	Gal
AS-Ganglio-N-triaoza II*	(-)	
AS-Ganglio-N-tetraoza	(-)	Gal, GalNAc
AS-AS-Ganglio-N-tetraoza din gangliozidul GD1a	+++**	Gal, GalNAc
AS-AS-Ganglio-N-tetraoza din gangliozidul GD1b	+++**	Gal, GalNAc
AS-AS-AS-Ganglio-N-tetraoza din gangliozidul GT1b	+++**	Gal, GalNAc

AS, acid sialic; * obţinută atât din gangliozidul GM2 cât şi din GM1a; ** hidrolizată numai până la AS-Ganglio-N-tetraoză

Iată câteva caracteristici ale acestor sialosil-oligozaharide:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

1.Sialosil2-3 galactoza. S-a obţinut un compus care dădea prin hidroliză numai acid sialic şi galactoză. Compusul respectiv s-a dovedit identic cu sialosil2-3galactoza obţinută prin acetoliza sialosil2-3lactozei (provenită din lapte matern sau colostru bovin). Deoarece sialosil-galactoza produce lixoză, prin oxidare cu periodat şi hidroliză acidă, rezultă că acidul sialic este legat în poziţia 3 a galactozei. Compusul este hidrolizat foarte uşor de către neuraminidază.

2. Sialosil-Ganglio-N-bioza II nu este hidrolizabilă de către neuraminidază dar produce prin hidroliză cu acid diluat un dizaharid anilinftalat-pozitiv şi Morgan-Elson pozitiv. Ganglio-N-bioza II dă prin hidroliză totală galactoză şi galactozamină. Cu tetraborat la încălzire N-bioza II nu formează cromogen Ehrlich pozitiv, prin urmare GalNAc nu se găseşte la capătul reducător.

3. Sialosil2-3lactoza, un compus identic cu sialosil2-3lactoza obţinută din colostru bovin.

4. Prin acetoliza gangliozidului GM1a se formează sialosil-ganglio-N-triaoza II şi sialosil-ganglio-N-triaoza I. Gangliozidul GM2 (un sialosil trihexozilceramid) dă în aceleaşi condiţii numai sialosil-triaoza II.

Cele două ganglio-N-triaoze neutre, I şi II, sunt anilinftalat pozitive şi Morgan-Elson pozitive, dar nu dau cromogen cu tetraboratul la încălzire. N-triaoza I, spre deosebire de N-triaoza II nu formează deloc glucoză prin hidroliză totală acidă.

5. Sialosil-ganglio-N-tetraoza se compune din Glc, Gal, GalNAc, acid sialic în raport molar 1:2:1:1. Prin hidroliză acidă (dar nu sub acţiunea sialidazei) rezultă din acest compus tetrazaharidul lipsit de acid sialic, ganglio-N-tetraoza.

6.Di-sialosil-ganglio-N-tetraoza obţinută din gangliozidul GD1a este izomeră cu di-sialosil-tetraoza obţinută din gangliozidul GD1b; în privinţa comportării cromatografice cei doi compuşi se deosebesc considerabil.

7.O tri-sialosil-tetraoză a fost obţinută prin degrarea gangliozidului GT1b. Numai două din cele trei resturi de acid sialic erau clivate cu sialidază.

Degradarea cu periodat. În gangliozidul GM1a un rest de galactoză este descompus rapid iar un rest de glucoză încet. În afară de restul de galactoză din poziţia 4 (în cadrul lactozei) glucoza nu are alţi substituenţi în poziţia 2 sau 3. Celălalt rest de galactoză din GM1a rămâne neatacat de către periodat. Deasemenea în sialosil-ganglio-N-tetraoză rămâne un rest de galactoză intact. Dacă însă ganglio-N-tetraoza este tratată cu periodat (şi ulterior supusă la hidroliza acidă), sunt degradate atît glucoza cât şi cele două resturi de galactoză şi rămâne nemodificată numai galactozamina. Ultima, datorită substituţiei în poziţia 3 (compară cu structura ganglio-N-biozei I), nu mai posedă nici o grupare glicol. Faptul că galactoza rămâne nemodificată în cazul sialozil-ganglio-N-tetraozei, dar nu in cazul ganglio-N-tetraozei, este o dovadă suplimentară pentru legarea AS la galactoză.

Dacă dupa degradarea N-tetraozei cu periodat urmează reducerea cu KBH_4 se obţine un produs de degradare şi anume eritrita (dintr-un rest de glucoză care este substituită în poziţia 4; compară cu obţinerea din lactoză), glicerina (din restul de galactoză terminal) şi treita care poate lua naştere numai din restul mijlociu de galactoză . Dacă N-tetraoza este redusă cu KBH_4 înainte de degradarea cu periodat rezultă, dupa degradare şi o nouă reducere cu KBH_4, conform aşteptărilor, numai glicerină şi treită şi nu rezultă deloc eritrită. Deasemenea din ganglio-N-triaoza I şi ganglio-N-bioza II se obţine, prin tratarea cu KIO_4/KBH_4, glicerină şi treită. Treita care a servit la identificarea cromatografică a fost preparată din esterul dietilic al acidului (+)-

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

tartric prin reducere cu $LiAlH_4$. Pentru comparaţie a fost degradată deasemenea Glc1-4Gal-(licobioza) care deasemenea a dus la treită.

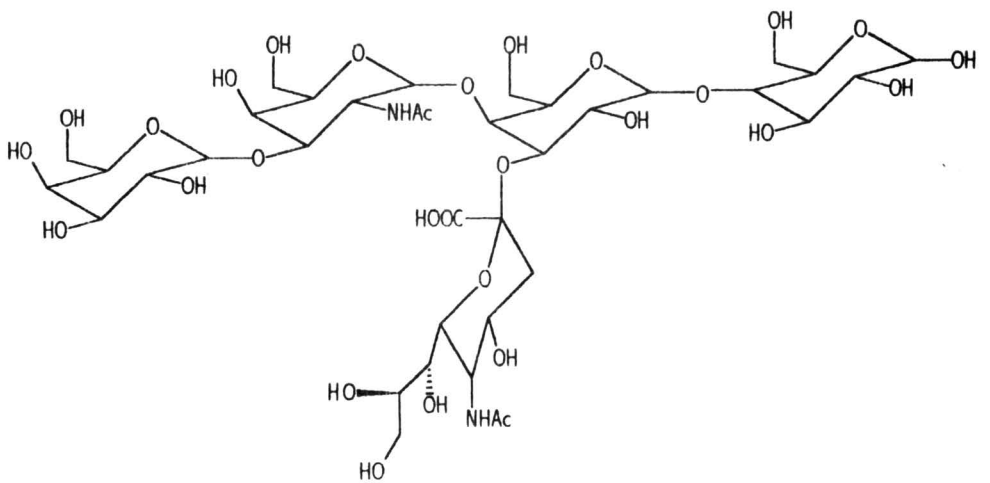
Structura ganglio-N-tetraozei. Formarea treitei din ganglio-N-tetraoză, precum şi din alţi compuşi, arată că ganglio-N-bioza I este legată la atomul de carbon 4 al restului de galactoză al lactozei pentru a forma un tetrazaharid. Valoarea rotaţiei ganglio-N-tetraozei şi a ganglio-N-triaozei II arată că această legătură centrală a tetraozei este ß-glicozidică (Tabelul 12).

Tabelul 12.Comparaţie între unghiul de rotaţie (α) calculat pentru cele două legături anomere posibile, α sau ß, şi unghiul de rotaţie (α) măsurat.

Soluţie la echilibru de	$(\alpha)_D$ calc. pentru legătura α	$(\alpha)_D$ calc. pentru legătura ß	$(\alpha)_D$ măsurat
Ganglio-N-triaoza II	+121,5°	+29,7°	+17,3°
Ganglio-N-tetraoză	+93,6°	+22,9°	+13,9°

Valorile $(\alpha)_D$ au fost calculate după metoda lui Hudson din următoarele valori M(α): lactoză = +18468° (soluţie la echilibru), α- respectiv ß-etil-2-acetamido-2-deoxi-galactopiranozid = +47750° respectiv -2520°, ganglio-N-triaoza II = +16218° (soluţie la echilibru) şi ß-metil-galactopiranozid = 0. În acest fel s-au elaborat formulele oligozaharidelor redate în Tab. 11 precum şi structura tetraozei: Galß1-3GalNAcß1-4Galß1-4Glc-.

Structura gangliozidului GM1a şi a gangliozidului GM2. Structura glucidelor conţinând AS precum şi studiile degradative cu periodat arată că AS este legat la atomul de carbon 3 al acelui rest de galactoză care aparţine fragmentului de lactoză al tetraozei:



Gangliozidului GM1a îi revine prin urmare următoarea structură: Galß1-3GalNAcß1-4(NeuNAcα2-3)Galß1-4Glcß1-1'Cer (Fig. 3).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

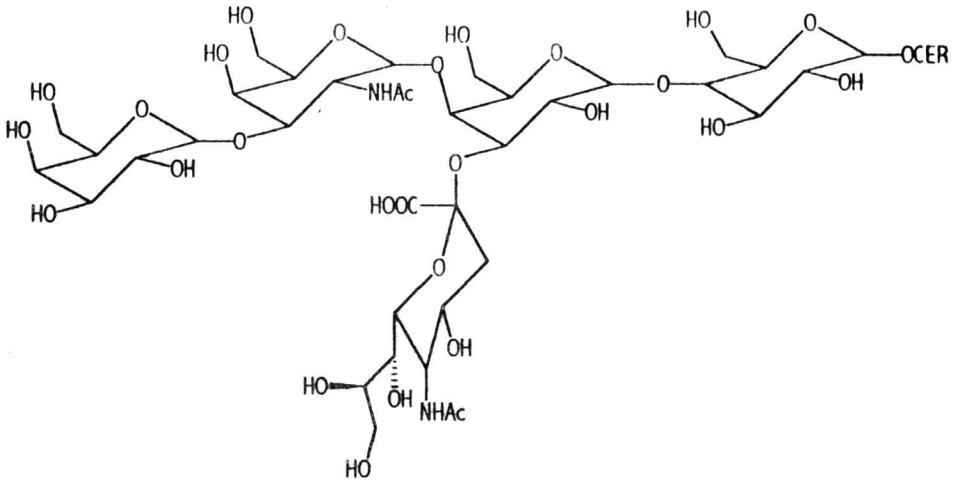


Fig. 3.Gangliozidul GM1a.

Structura gangliozidului GM1a a fost confirmată prin sinteză chimică; au fost obţinute următoarele caracteristici RMN pentru gangliozidul GM1a sintetizat (A. Hasegawa şi colab., 1993): δ 0,90 (t, 6H, 2*Me*CH_2), 1,25 (s, 50H, 25CH_2), 1,47 (larg, m, 2H, $COCH_2CH_2$), 1,85, 1,90 (2s, 6H, 2AcN) (spectrul RMN-^{1}H a fost elaborat în $(CD_3)_2SO$-D_2O, 49:1).

Radicalul de acid sialic se găseşte prin urmare în poziţia ''cis'' cu restul ganglio-N-bioza I care este legată la atomul de carbon 4 al aceleiaşi molecule de galactoză. Datorită apropierii spaţiale a substituenţilor voluminoşi înţelegem rezistenţa gangliozidului GM1a la sialidază. Pentru această ipoteză pledează faptul că nu numai GM1a ci oricare oligozaharid conţinând AS, obţinut din GM1a, în măsura în care conţine un substituent la C-4 a acestui rest de galactoză, nu este atacat de către sialidază. Pe de altă parte AS2-3 galactoza şi AS2-3lactoza, care nu mai posedă nici un substituent în poziţia 4, sunt uşor hidrolizate enzimatic.

Legarea ganglio-N-tetraozei cu gruparea OH din poziţia unu a sfingozinei a fost dovedită prin ozonizare şi fragmentare ulterioară. Ca şi în cazul gangliozidului descris de către Klenk, cel descris de către Kuhn şi Wiegandt conţine acid stearic ca acid predominant.

Gangliozidul GM2 amintit la început, care a fost găsit în creierul normal numai în cantităţi relativ mici, este deasemenea nehidrolizabil de către sialidază. Pe baza fragmentului glucidic care stă la baza lui GM2 acesta a putut fi identificat ca AS-ganglio-N-triaoza II (compară cu Tab. 10 şi Tab. 11). GM2 se deosebeşte de GM1a prin lipsa galactozei terminale. Prin urmare structura gangliozidului GM2 este următoarea:
GalNAcß1-4(NeuNAcα2-3)Galß1-4Glcß1-1'Cer (Fig. 4)

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

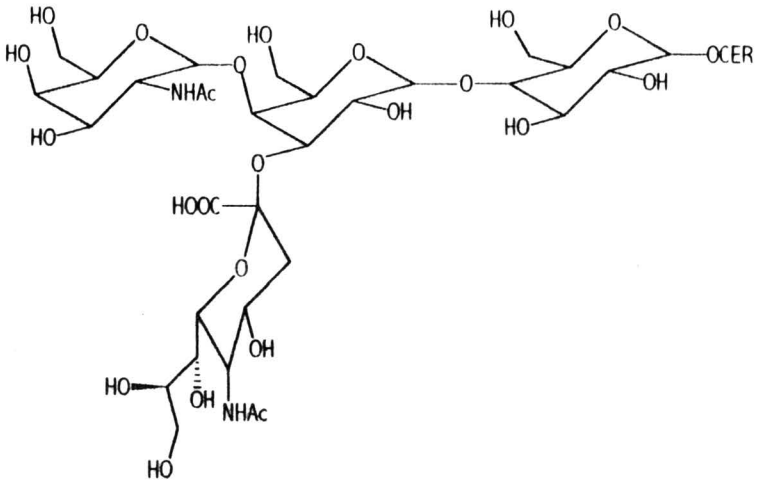


Fig. 4.Gangliozidul GM2 (gangliozidul Tay-Sachs).

2.3.2.Gangliozidele GD1a şi GD1b

Încă de la obţinerea lor s-a constatat că cele două gangliozide sunt izomere. Ambele se transformă prin tratare cu sialidază din *Vibrio cholerae* în GM1a. Prin urmare mai rămânea de clarificat poziţia celui de-al doilea rest de acid sialic. Experimente de permetilare (v. mai jos) au arătat că în cazul gangliozidului GD1a cel de-al doilea rest de NeuAc este ataşat la gruparea 3-hidroxil a restului terminal de galactoză. În concordanţă cu aceasta s-a observat că gangliozidul GD1b dă numai pe jumătate cantitatea de formaldehidă pe care o dă gangliozidul GD1a, la oxidare cu periodat; în felul acesta catena terminală triol a NeuAc este liberă numai la unul din cele două resturi în cazul lui GD1b. În plus oxidarea cu periodat a lui GD1b urmată de reducere cu $NaBH_4$ şi hidroliză ducea la eliberarea de glicerol, care în mod obligatoriu provine din galactoza terminală; se exclude astfel posibilitatea legării celui de-al doilea rest de NeuAc la gruparea 3-hidroxil a Gal terminale. Aceste constatări alăturate la studii asupra produşilor de hidroliză parţială obţinuţi înainte şi după oxidare cu periodat au indicat structura celor două gangliozide, GD1a: NeuAcα2-3Galß1-3GalNAcß1-4(NeuAcα2-3-)Galß1-4Glcß1-1'Cer (Fig 5) şi GD1b: Galß1-3GalNAcß1-4(NeuAcα2-8NeuAcα2-3-)Galß1-4Glcß1-1'Cer (Fig 6).

Gangliozidul GD1a a fost obţinut şi prin sinteză chimică (A. Hasegawa şi colab., 1993); iată câteva caracteristici RMN-H ale gangliozidului GD1a sintetizat: δ 0,85 (t, 6H, 2*Me*CH_2), 1,23 (s, 52H, 26CH_2), 1,76, 1,88, 1,89 (3s, 9H, 3AcN), 2,60, 2,68 (2dd, 2H, Jgem = 12,5 Hz, $J_{3eq,4}$ = 4,5 Hz, H-$3_{e,f-eq}$), 4,18 (d, $J_{1,2}$ = 8,0 Hz, H-1b), 4,28, 4,30 (2d, 2H, $J_{1,2}$ = 7,7 Hz, H-1c,d), 4,80 (d, 1H, $J_{1,2}$ = 7,8 Hz, H-1a), şi 5,36, 5,58 (2m, 2H, H-4,5 pentru unitatea Cer) (spectrul RMN-^{1}H a fost elaborat în $(CD_3)_2SO$-D_2O, 49:1). Spectrul IR (KBr) ale aceluiaşi compus a prezentat următoarele semnale: 3700-2800 (OH, NH), 2940 şi 2850 (Me, metilen), 1700 (C=O), 1650 şi 1550 cm^{-1} (amidă).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

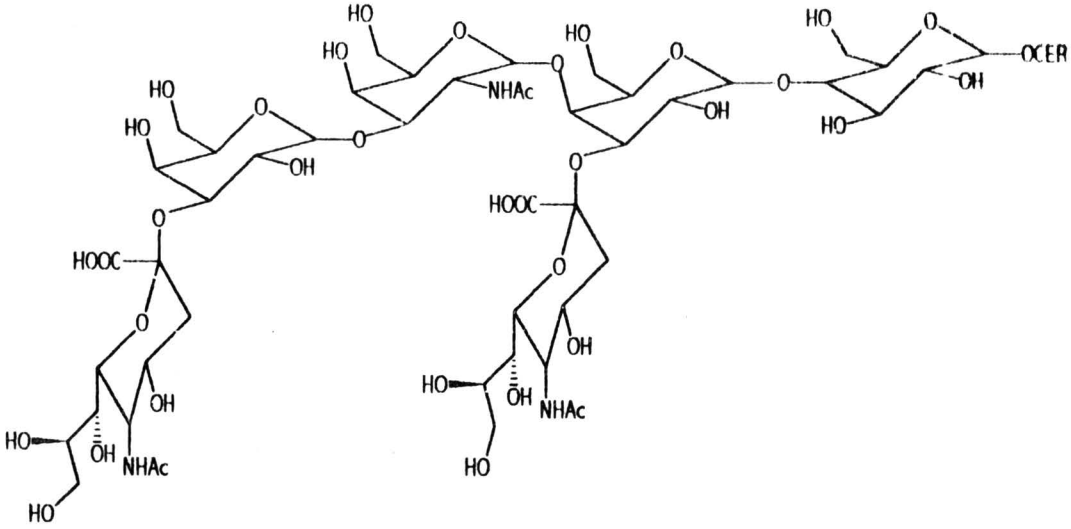


Fig.5. Gangliozidul GD1a.

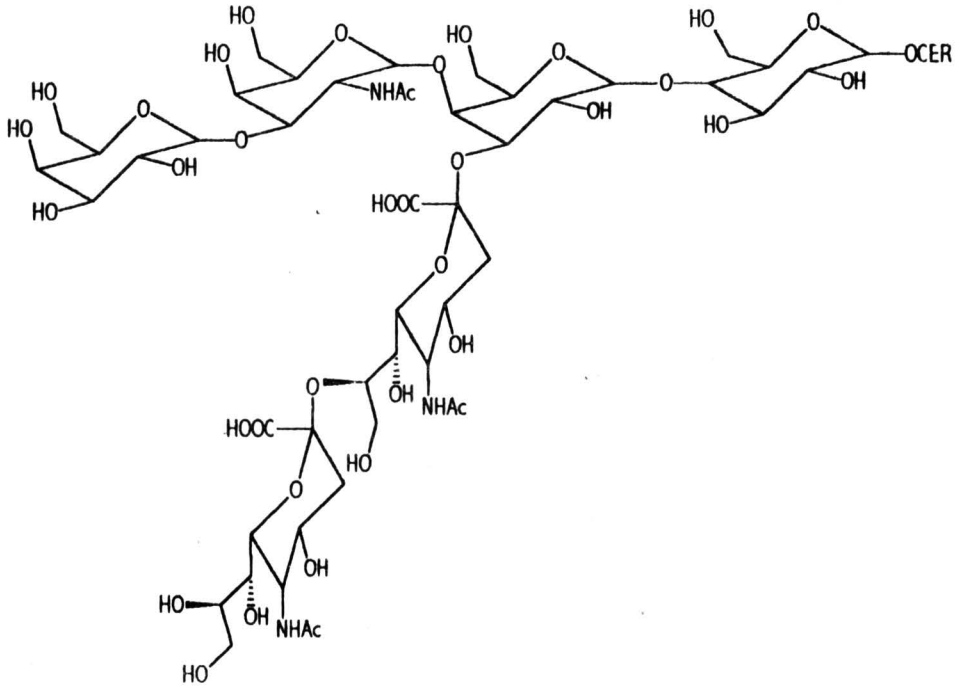


Fig. 6. Gangliozidul GD1b

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

2.3.3.Gangliozidul GT1b

Gangliozidul GT1b a fost găsit inițial în creier uman și în creier bovin (C. C. Sweeley și B. Siddiqui, 1977) . Prin tratare cu neuraminidază era convertit cantitativ la gangliozidul GM1a. Structura sa a fost propusă de către Kuhn și Wiegandt pe baza rezultatelor oxidării cu periodat a sialosil-oligozaharidelor, cu și fără reducere cu borohidrură de sodiu, din care rezultă amestecuri de produși identici cu cei obținuți fie din GD1a, fie din GD1b. Structura gangliozidului GT1b a fost confirmată de către Klenk: NeuAcα2-3Galß1-3GalNAcß1-4(NeuAcα2-8NeuAcα2-3)Galß1-4Glcß1-1'Cer (Fig 7).

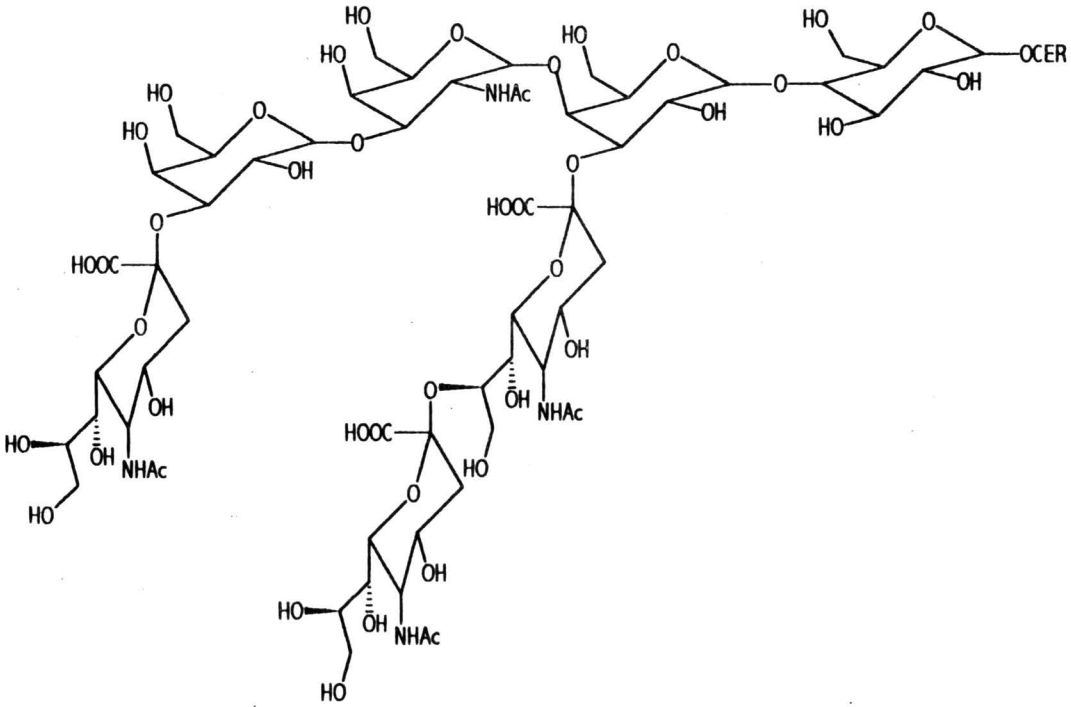


Fig. 7.Gangliozidul GT1b

2.3.4.Fucoglicosfingolipide

Al doilea gangliozid ca abundență în ficat bovin, după NANA-LacCer, este un gangliozid ce conține fucoză. S-a găsit că acesta inhibă puternic aglutinarea eritrocitelor din grupa O a sângelui uman de către *Ulex europaeus* la o concentrație de 125 µg/ml (H. Wiegandt, 1973). Analiza carbohidraților a indicat că acest gangliozid conține Glc, Gal, GalNAc, Fuc și NeuGc în raportul molar 1:2:1:1:1. Hidroliza acidă blândă a neuraminosil-oligozaharidului a dus la gangliotetraoză și două pentazaharide, dintre care una avea mobilitate identică cu NeuGcαII^{3}Gg la cromatografia pe hârtie și nu era clivată de către neuraminidază. Permetilarea a sprijinit dovada

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

serologică pentru fragmentul Fucα1-2Gal. Alte date au indicat că structura gangliozidului respectiv este IV^{2}αFucII^{3}αNeuGc-Gg4Cer (Fig. 8)

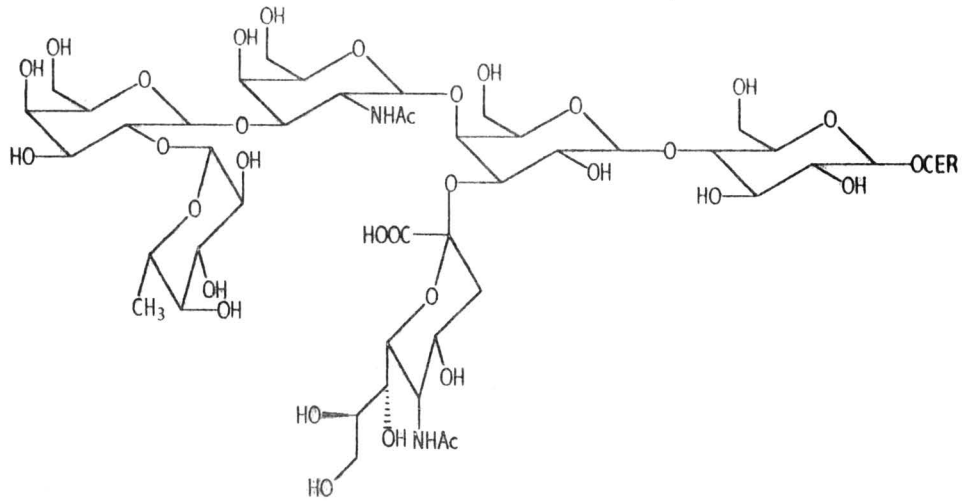


Fig. 8.Gangliozidul Fuc-GM1.

S-a relatat că la şobolan Fuc-GM1 şi GM1, ca determinanţi de grupă sanguină B (E. H. Holms şi S. Hakomori, 1982), precum şi asialo-GM1 şi Fuc-GM1 apar în ficatul de şobolan în urma transformărilor maligne prin carcinogeneză chimică (H. Bauman şi colab., 1979) precum şi într-o formă liberă, cu malignitate înaltă, de celule hepatoma din ascită de şobolan (T. Hirabayashi şi colab., 1978); M. Matsumoto şi T. Taki (1976)). Fuc-GM1 este unul dintre gangliozidele majore din celule parenchimale din ficat de şobolan (K. Ueno şi colab., 1982) precum şi din eritrocite de la aceeaşi specie (C. Rokukawa şi colab., 1982; M. Iwamori şi colab., 1983).

Concentraţia AS lipidic în eritrocite de şobolan este egală cu 2,33 μmol/g ţesut uscat, iar raportul molar între AS lipidic şi fosforul lipidic este de 3,1. Cele mai abundente gangliozide în aceste celule sunt: GD1a (41,2%), GM1 (36,5%) şi Fuc-GM1 (22,3%). Structura gangliozidului Fuc-GM1 din acest ţesut a fost demonstrată prin utilizarea α-fucozidazei şi prin SM-BAR a ionilor negativi (M. Iwamori şi colab., 1984). Căile metabolice legate de asialo-GM1ar putea fi căi majore în ţesuturile şobolanului. Pentru aceasta pledează mai multe rezultate cum ar fi: izolarea asialo-GM1 bis-sulfatat din rinichi de şobolan (K. Tadano şi colab., (1982)) şi larga distribuţie a asialo-GM1, după cum s-a demonstrat prin procedee imunologice prin utilizarea anticorpilor anti-asialo GM1 în următoarele celule provenite de la şobolan: limfocite, mielocite, megacariocite (T. Momoi şi colab., (1980)). Miezul structural al fucozil glicolipidului izolat din macrofage de şobolan (care a fost caracterizat ca receptor pentru factorul de inhibiţie al migrării macrofagelor), Galα1-3(Fucα1-2)Galß1-3GalNAcß1-3Galß1-4Glcß1-1Cer, diferă de asialo GM1 numai prin legătura 1-3, în loc de o legătură 1-4 la fragmentul Gal al celui de-al doilea glucid dinspre Cer (E. Hanada şi colab., 1977); E. Hanada şi colab., (1978); T. Miura şi colab., (1979)). Pe de altă parte, s-a arătat că are loc o inducţie a glicolipidelor de tip ganglio în ţesuturile şi celulele şobolanului ca rezultat a transformării oncogene. Gg4Cer şi Fuc-Gg4Cer au fost găsite în hepatoma AH7974F de ascită de şobolan; gangliozidul GD1b, Fuc-GM1 şi Fuc-GM1 plus α-Gal-αFuc-GM1 s-au acumulat, respectiv, în hepatoma 27 de şobolan (E. V. Dyatolovitskaya şi

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

colab., 1976), hepatoma 1135 de şobolan şi tumori din ficat de şobolan induse cu N-2-acetilaminofluoren.

Glicolipidele din fluidele extracelulare sunt absorbite *in vivo* şi *in vitro* de către celule. Anumite glicosfingolipide acide din plasma sanguină umană, inclusiv Fuc-GM1, sunt adsorbite de către eritrocite şi au rolul de a exprima antigenicitatea de grup sanguin specific (D. M. Marcus şi L. E. Cass, 1969). S-a sugerat deasemenea că eritrocitele porcine eliberează di-, tri- şi tetraglicozilceramide în plasma sanguină (G. Dawson şi C. C. Sweeley, 1970). S-a demonstrat că plasma şi serul sanguin de la suine conţin polihexozilceramide cu 1-4 glucide neutre, predominante fiind cele din seria globo (E. Cole şi J. L. Foote, 1970; J. T. R. Clarke şi J. M. Stolz, 1979). Plasma sanguină de la diferite specii animale, în mod similar cu alte ţesuturi, posedă o paletă de glicolipide caracteristică speciei. Printre glicosfingolipidele acide (două sulfatide şi cinci gangliozide) izolate din plasmă sanguină de suine s-a aflat şi gangliozidul fucozil-GM1 (G. Hanagata şi colab., 1990). Experimentul a decurs în felul următor. Sângele proaspăt de suine a fost recoltat pe citrat şi centrifugat pentru a obţine plasma. A urmat dializa faţă de apă pentru a îndepărta substanţele acvosolubile şi adaos de etanol la o concentraţie finală de 70% pentru a precipita proteinele; pentru aceasta a urmat o nouă centrifugare. Precipitatul a fost extras cu etanol 70% la 70 ^{0}C timp de câteva minute (5-10 volume). Primul şi al doilea extract au fost amestecate şi concentrate la sec în vid. Rezidiul a fost extras de două ori cu acetonă şi eter dietilic pentru a îndepărta lipidele neutre şi fosfolipidele (S. Gasa şi A. Makita, 1980); au urmat trei extracţii cu cloroform-metanol iar cele trei extracte în cloroform-metanol au fost amestecate şi supuse hidrolizei alcaline selective. A urmat cromatografia de schimb ionic pe DEAE-Sephadex A-25, după cum s-a descris anterior (S. Gasa şi A. Makita, 1980). Glicolipidele acide au fost cromatografiate pe coloană de Iatrobeads (Iatron, Japonia); eluţia s-a realizat cu amestecuri de cloroform-metanol-apă. Fracţiile neomogene în privinţa glicosfingolipidelor au fost re-cromatografiate similar pentru a obţine compuşi omogeni.

Spectrometria de rezonanţă magnetică nucleară (RMN) protonică s-a realizat pe glicolipide izolate (1 mg) în hexadeuterodimetil sulfoxid/ $^{2}H_2O$, 400/8 (în volume), la temperatura de 90^{0}C cu un aparat Varian JNM-GX500 utilizând transformata Fourier şi un calculator JEC-9808 (S. Gasa şi colab.,, 1983). Frecvenţa a fost 500 MHz iar zonele de investigaţie au avut 5 kHz. Deplasările chimice au fost indicate prin distanţa (ppm) de semnalul tetrametilsilanului ca standard intern.

Varietatea moleculară a acidului sialic în gangliozide a fost determinată prin cromatografie gaz-lichid ca derivaţi trimetilsilil (R. K. Yu şi R. W. Ledeen, 1970) (Tabelul 13).

Tabelul 13.Concentraţia relativă a glicosfingolipidelor în plasmă sanguină de suine şi compoziţia în acid sialic.

Glicosfingolipid	Conţinutul relativ (%)	NeuAc (%)	NeuGc (%)
Sulfatid	10	-	-
LacCer sulfat	8	-	-
GM3	46	58	42
GM1	3	59	41
GD3	24	77	23
GD1a	5	73	27
Fuc-GM1	4	56	44

Câteva caracteristici RMN ale unor fuco-glicosfingolipide sunt prezentate în Tabelul 14.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Tabelul 14.Caracteristici RMN ale unor glicosfingolipide fucozilate în funcție de structură.

	Fucα1 —— 2Galß1 —— 3GlcNAcß1 —— 3Galß1 —— 4Glcß1-1Cer				
δ(H-1)	4,99	4,45	4,60	4,28	4,16
J	3,0	7,3	8,5	7,3	7,7
δ(H-2)	3,51	3,51	3,49	3,43	3,04
δ(H-3)	3,51	3,52	3,81	3,47	3,33
δ(H-4)	3,51	3,66	3,21	3,84	-
δ(H-5)	4,07	-	3,18	-	-

	Fucα1 —— 2Galß1 —— 4GlcNAcß1 —— 3Galß1 —— 4Glcß1-1Cer				
δ(H-1)	5,03	4,33	4,64	4,26	4,16
J	3,0	7,4	7,5	7,1	8,0
δ(H-2)	3,55	3,54	3,45	3,42	3,04
δ(H-3)	3,55	3,55	3,53	3,45	3,33
δ(H-4)	3,42	3,66	3,49	3,85	-
δ(H-5)	4,00	-	3,23	-	-

	2Galß1 —— 3(Fucα1-4) — GlcNAcß1 —— 3Galß1 —— 4Glcß1-1Cer				
δ(H-1)	4,31	4,78	4,77	4,28	4,16
J	7,5	4,0	7,5	7,0	7,5
δ(H-2)	3,28	3,50	3,62	3,45	3,04
δ(H-3)	3,32	3,59	3,87	3,45	3,33
δ(H-4)	3,66	-	3,56	3,87	-
δ(H-5)	-	4,58	-	-	-

	Fucα1-2Galß1 —— 3(Fucα1-4) — GlcNAcß1 —— 3Galß1 —— Glcß1-1Cer					
δ(H-1)	4,91	4,53	4,77	4,64	4,28	4,17
J	4,0	7,1	4,0	7,7	8,0	8,0
δ(H-2)	3,50	3,46	3,49	3,57	3,44	3,04
δ(H-3)	3,60	3,42	3,61	3,95	3,43	3,33
δ(H-4)	-	3,70	-	3,49	3,85	-
δ(H-5)	4,19	-	4,60	-	-	-

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

2.3.5. IZOMERIA GANGLIOZIDELOR

Gangliozidele au fost găsite inițial în creier (R. Kuhn și H. Wiegandt, 1963; R. Kuhn și colab., 1961; L. Svennerholm, 1963) iar ulterior în multe țesuturi ale vertebratelor: rinichi și splină de cal (S. Gasa și A. Makita, 1980), glande suprarenale de cobai (M. Sekine și colab., 1984), plasmă sanguină (G. Hanagata și colab., 1990), țesut testicular (D. P. Iga și colab., 1998). Gangliozidul GM1a (GM1) a fost utilizat ca agent farmacologic capabil să mărească gradul de recuperare după accidente cerebrale (J. C. Samson, 1990).

Izomeria extrem de pronunțată a gangliozidelor pare să fie o particularitate unică a acestei clase de compuși. În cele ce urmează se vor discuta diferite metode - biochimice, chimice și fizice - utilizate în rezolvarea problemelor legate de izomeria gangliozidelor seriei gangliotetraoză.

Ne vom baza în discuția următoare pe structura gangliozidului GM1a (G I, GM1) stabilită de către Kuhn și Wiegandt (1963).

Tabelul 15 prezintă câteva gangliozide izomere: monosialo-, disialo-, trisialo- și tetrasialoizomeri.

Tabelul 15.Gangliozide izomere.

Galß1 — 3GalNAcß1 — 4Galß1 — 4Glcß1 — 1'Cer
3 | 3 |
OR^2 OR^1

Ganglio-zid	Radical	
	R^2	R^1
GM1a	H	NeuNAcα2-
GM1b	NeuNAcα2-	H
GD1a	NeuNAcα2-	NeuNAcα2-
GD1b	H	NeuNAcα2-8NeuNAcα2-
GD1c	NeuNAcα2-8NeuNAcα2-	H
GT1a	NeuNAcα2-8NeuNAcα2-	NeuNAcα2-
GT1b	NeuNAcα2-	NeuNAcα2-8NeuNAcα2-
GT1c	H	NeuNAcα2-8NeuNAcα2-NeuNAcα2-

Tetrasialogangliozidele sunt simbolizate în nomenclatura internațională astfel: tetrasialogangliozidul GQ1b, IV^3(NeuNAc)$_2$ II^1(NeuNAc)$_2$Gg4Cer; tetrasialogangliozidul GQ1c, IV^3(NeuNAc) II^1(NeuNAc)$_3$Gg4Cer. Semnificații: cifrele romane indică numerotarea glucidelor neutre începând de la ceramid, cifrele arabe superscrise indică poziția de legare pe glucidul respectiv, cifrele arabe subscrise indică numărul de resturi, Gg4 prescurtează fragmentul gangliotetraozil.

Gangliozidul GM1a a fost izolat din creier iar izomerul său GM1b din membrana eritrocitului uman (K. Watanabe și colab., 1979) sau ca produs de biosinteză a unui sistem glicozil transferazic provenit din celulele măduvei osoase (T. Taki și colab., 1981) sau ale ficatului de șobolan (G. Pohlentz și colab., 1988). GD1a și GD1b au fost găsite în creierul de la diferite specii: om, bovine, șobolan, pisică, găină, câine (M. Iwamori și Y. Nagai, 1978) precum și în diferite organe de la șobolan: creierul mare, creierul mic, cord spinal, ficat, splină (M. Iwamori și colab., 1984). GD1c a fost caracterizat ca produs de biosinteză a veziculelor Golgi din ficatul de

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

şobolan. Trisialo-izomerii gangliozidelor au fost purificaţi indeosebi din creier : GT1b şi GT1a din creier uman (S. Ando şi R. K. Yu, 1977) iar GT1c din creier de cod (I. Ishizuka şi H. Wiegandt, 1972). Tetrasialogangliozidele izomere au fost purificate din creier uman, creier bovin şi creier de găină (GQ1b) precum şi din creier de cod (S. Ando şi R. K. Yu 1979).

Un alt tip de izomerie, a gangliozidelor din seria lactoză, demonstrat în cazul lui GD3 (S. Ren şi colab., 1992), a fost corelată cu poziţia acetilării NeuNAc terminal: în poziţia 7 sau poziţia 9.

Gangliozidele izomere au fost integrate coerent în schemele de biosinteză (H. Iber şi colab., 1989, B. Freischutz şi colab., 1994).

2.3.5.1. Enzime implicate în studiul izomeriei gangliozidelor

Exo-glicozilhidrolazele specifice, care catalizează hidroliza restului glucidic de la capătul nereducător al catenei poliglucidice, au fost utilizate pentru a determina secvenţa resturilor glucidice şi configuraţia anomeră a legăturii glicozidice (R. W. Ledeen şi R. K. Yu, 1982; M Iwamori şi colab., 1984).

Modul de acţiune al exo-glicohidrolazelor asupra gangliozidelor a oferit primul model de acţiune secvenţială şi concertată al mai ultor enzime asupra aceluiaşi substrat (S. Gatt, 1969). Enzimele respective au fost deasemenea utilizate cu succes pentru a distinge între ganglozidele izomere.

Următoarele enzime au fost utilizate pentru a rezolva problema izomeriei gangliozidelor:

1. Neuraminidaza (sialidaza) din *Clostridium perfringens* (S. Gasa şi A. Makita, 1980; M. Sekine şi colab., 1984; S. Ando şi R. K. Yu, 1979) sau *Vibro cholerae* (M. Iwamori şi colab., 1984; K. Watanabe şi colab., 1979) a fost utilizată pentru a hidroliza resturile de acid sialic ale gangliozidelor cu excepţia celor care sunt ataşate la un rest de de galactoză având substituit adiacent în poziţia C-4 GalNAc (ca în GM2 sau GM1a) sau [illegible]NAc. S-a demonstrat că după îndepărtarea Gal terminale din GM1a, cu ß-galactozidază, şi apoi a hexozaminei, acidul sialic putea fi eliberat prin tratare cu neuraminidază.

Supunând polisialo-gangliozidele cuprinse în Tab. 7 la neuraminidaza de mai sus a rezultat GM1a (S. Ando şi R. K. Yu, 1979).

2.Neuraminidaza virusului pestei păsărilor este specifică faţă de legătura NeuAcα2-3Gal, în timp ce legătura NeuNAcα2-8NeuNAc rămâne practic nescindată (I. Ishizuka şi H. Wiegandt, 1972).

3.ß-Galactozidaza şi ß-hexozaminidaza, ambele din soia sau ficat uman (G. Pohlentz şi colab., 1988); cele două enzime hidrolizează Galß1- şi respectiv GalNAcß1- aflate în poziţie terminală.

Utilizarea enzimelor. Rezistenţa gangliozidului GM1a la neuraminidaza din *Cl. perfringens* sau *Vibrio cholerae* a fost utilizată pentru prepararea selectivă a lui GM1a din polisialogangliozide (H. Rauvala, 1979; M. Umeda şi colab., 1984). Pe de altă parte s-a arătat că GM1a este clivat de către ß-galactozidază, rezultând gangliozidul GM2 (S. Gatt, 1969).

Izomerul lui GM1a, GM1b, este hidrolizat rapid de către neuraminidază rezultând asialo-derivatul (K. Watanabe şi colab., 1979).

Disialogangliozide. S-a arătat că ambii disialo-izomeri, GD1a şi GD1b, sunt clivaţi de către neuraminidaza din *Cl. perfringens* sau *V.cholerae* la acelaşi produs, GM1a. În condiţii identice GD1c ar da un asialo-derivat, fiind astfel identificat. Pe de altă parte neuraminidaza virusului pestei păsărilor distinge între gangliozidele izomere GD1a şi GD1b: GD1a este scindat la GM1a în timp ce GD1b este lăsat intact.

Trisialogangliozidele. Gangliozidele GT1a şi GT1b au fost identificate printr-un studiu cinetic al clivării lor cu neuraminidza din *Cl. perfringens*: GT1a era convertit la GD1a în timp ce GT1b era clivat la GD1b. GT1c a fost caracterizat prin rezistenţa sa la neuraminidaza virusului pestei

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

păsărilor. Tabelul 16 arată că succesiunea de atac a enzimelor hidrolitice este caracteristică unui gangliozid.

Tabelul 16.Succesiunea clivării gangliozidelor de către exoglicozil-hidrolaze.

Gangliozidul	Succesiunea clivării
GM1a	1.ß-Galactozidaza 2.ß-Hexozaminidaza 3.Sialidaza* 4.ßgalactozidaza 5.ß-Glucozidaza
GM1b	1.Sialidaza 2.ß-Galactozidaza 3.ß-Hexozaminidaza 4.ß-Galactozidaza 5.ß-Glucozidaza
GD1a	1.Sialidaza 2.ß-Galactozidaza 3.ß-Hexozaminidaza 4.Sialidaza 5.ß-Galactozidaza 6.ß-Glucozidaza
GD1b	1.Sialidaza sau ß-galactozidaza 2.ß-Galactozidaza sau sialidaza 3.ß-Hexozaminidaza 4.ß-Galactozidaza 5.ß-Glucozidaza
GD1c	1.Sialidaza 2.Sialidaza 2.ß-Galactozidaza 4.ß-Hexozaminidaza 5.ß-Galactozidaza 6.ß-Glucozidaza

* Sialidaza provine din *Clostridium perfringens* sau *Vibrio cholerae*

2.3.5.2.Oxidarea cu periodat

Oxidarea cu periodat a fost frecvent utilizată pentru stabilirea poziţiei de substituţie glicozidică în partea oligozaharidică a gangliozidelor. Periodatul este un reactiv care clivează legăturile C-C a diolilor adiacenţi precum şi a compuşilor înrudiţi (de ex.1,2-amino alcooli, 2-ceto alcooli etc). (Dependenţa naturii chimice a produşilor de oxidare cu periodat a unui monoglucid în funcţie de poziţia grupării hidroxil substituite este descrisă amănunţit în lucrarea "Chimia Bioorganică", D. P. Iga şi Silvia Iga, Editura Universităţii Bucureşti, 1996). Aldehidele

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

generate astfel sunt fie determinate (R. Kuhn şi H. Wiegandt, 1963; G. A. Johnson şi R. H. McCluer, 1964), fie reduse cu borohidrură de sodiu iar fragmentele respective eliberate prin hidroliză acidă şi identificate (S. Ando şi R. K. Yu, 1977; I. Ishizuka şi H. Wiegandt, 1972; S. Ando şi R. K. Yu, 1979). S-a stabilit că modificând concentraţia de periodat este posibilă realizarea unei distincţii între grupările hidroxil vicinale "cis" (de ex. grupările hidroxil de la C-3 şi C-4 din galactoza terminală a gangliozidului GM1a) şi grupările OH- vicinale "trans" (de ex. grupările hidroxil de la C-2 şi C-3 ale glucozei integrate în GM1a). Mai precis, concentraţii de periodat de 0,010-0,015 M clivează în mod strict numai legătura C-C "cis" a grupărilor hidroxil vicinale ("oxidare specifică") în timp ce concentraţii de periodat de 0,100-0,20 M clivează în plus legături C-C ale grupărilor hidroxil "trans"("oxidare nespecifică") (G. A. Johnson şi R. H. McCluer, 1964). În acelaşi timp acidul sialic având un substituent la gruparea hidroxil C-8 nu este afectat dar acidul sialic având două grupări hidroxil vicinale libere este oxidat la un fragment C_7 (T. Ariga şi colab., 1983). Prin urmare oxidarea cu periodat permite identificarea legăturii NeuNAcα2-8NeuNAc. Johnson şi McCluer au arătat că supunând gangliozidul GM1a la oxidare cu periodat 0,01 M erau oxidate galactoza terminală şi acidul sialic. În molecule având galactoza terminală legată de acid sialic (ca de ex. în gangliozidele GM1b, GD1a, GT1b) ambele resturi de galactoză erau protejate faţă de oxidarea cu periodat.

Kuhn şi Wiegandt au observat că se obţine formaldehida numai pe jumătate la oxidarea gangliozidului GD1b în comparaţie cu GD1a, prin urmare în gangliozidul GD1b numai o catenă laterală diol a NeuNAc este liberă.Oxidarea cu periodat a fost utilizată pentru a distinge între izomerii GT1a şi GT1b pe de o parte şi GT1c pe de altă parte. Tabelul 17 ilustrează astfel de rezultate.

Tabelul 17.Resturile oxidate de către periodat în funcţie de structura gangliozidului.

Gangliozid	Resturi oxidate
GM1a	Gal
	NANA
GM1b	NANA
GD1a	NANA
	NANA
GD1b	Galactoza
	NANA
GD1c	NANA
GT1a	NANA
	NANA
GT1b	NANA
	NANA
GT1c	Gal
	NANA

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

2.3.5.3. Hidroliza acidă parțială

Hidroliza acidă parțială se realizează în condiții blânde (concentrația acidului, temperatură) în care unele molecule ale compusului studiat ramân intacte iar altele sunt clivate într-o masură mai mare sau mai mică. Identificarea și caracterizarea fragmentelor au condus la elucidarea structurii de bază. Kuhn și colab., (1961) au stabilit izomeria gangliozidelor GD1a și GD1b constatând că ambii compuși duceau la GM1a prin hidroliză acidă blândă.

Hidroliza acidă parțială a fost utilizată cu succes în cazul gangliozidelor cu o structură mai complexă. Ishizuka și Wiegandt (1972) au stabilit fără echivoc localizarea resturilor de acid sialic pe izomerul GT1c din creier de cod, prin identificarea ca produs principal de hidroliză parțială a gangliozidului GD1b. Ando și Yu (1977) au caracterizat izomerii GT1 din creier uman cu ajutorul produșilor hidrolizei acide menajate: GT1a dădea GD1a și GM1a în timp ce GT1b dădea GD1b, GD1a și GM1a. Tetrasialoizomerii GQ1 au fost deasemenea distinși cu ajutorul hidrolizei acide parțiale: GT1a a fost identificat ca un produs caracteristic al hidrolizei lui GQ1b (din creier uman) în timp ce izomerul lui, GQ1c (din creier de cod), era clivat într-un mod diferit: de ex. nu se obținea deloc GT1a (S. Ando și R. K. Yu, 1979).

2.3.5.4. Permetilare-acetoliză

Procedeul se bazează pe faptul că legăturile glicozidice sunt mai labile la hidroliza acidă decât celelalte legături chimice ale gangliozidului. Metoda permetilare acetoliză a servit îndeosebi la clarificarea izomeriei monosialo- și disialo-gangliozidelor; (pentru utilizarea ei vezi Determinarea secvenței fragmentului oligoglucidic).

2.3.5.5. Spectrometria de masă

Spectrometria de masă a devenit un instrument utilizat din ce în ce mai des pentru elucidarea structurii, determinarea masei moleculare, identificarea speciilor moleculare și determinarea secvenței de carbohidrați din glicolipide. Implicit, au fost rezolvate probleme de izomeria gangliozidelor prin această tehnică. Principalul avantaj al spectrometriei de masă este cantitatea redusă de substanță necesară. Mai trebuie adăugat că glicolipide conținând până la 12 glucide precum și gangliozide complexe, ca de ex GQ1b, au fost analizate prin metoda impactului de electroni. Watanabe și colab., (1979) au distins între monosialo-izomerii GM1b, din membrana eritrocitară umană, și GM1a, din creier uman, prin identificarea ionilor caracteristici ce se formează din produsul permetilat: GM1b dă ioni cu m/e 376 (acidul sialic terminal), 580 (acid sialic-hexoza-) și 825 (acid sialic-hexoză-hexozamină-) în timp ce GM1a dă ioni cu m/e 219 (hexoză terminală), 464 (hexoză-hexozamină-). GM1b desializat dă deasemenea ultimii doi ioni. Câteva rezultate obținute de către Gasa și Makita (1980) pentru gangliozidele din rinichi și splină de cal sunt indicate în Tabelul 18.

Tabelul 18. Fragmente caracteristice din gangliozide permetilate

Gangliozid	m/e	Semnificație
R-GM3* și S-GM3*	376	NANA nesubstituit
" "	406	NGNA nesubstituit
" "	580	NANA-hexoză
" "	610	NGNA-hexoză

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

R-GM2 şi R-GM2	260	N-Acetil-hexozamină nesubstituită
" "	376	NANA nesubstituit
" "	406	NGNA nesubstituit
R-GM1a şi S-GM1a	219	Hexoză
" "	376	NANA nesubstituit
" "	406	NGNA nesubstituit
" "	464	Hexoza-N-acetil-hexozamină
R-GD3	376	NANA nesubstituit
"	406	NGNA nesubstituit
"	737	NANA-NGNA sau NGNA-NANA
"	767	NGNA-NGNA
R-GD1a şi S-GD1a	376	NANA nesubstituit
" "	406	NGNA nesubstituit
" "	580	NANA-hexoză
" "	610	NGNA-hexoză
S-GD1b	219	Hexoză
"	376	NANA nesubstituit
"	406	NGNA nesubstituit
"	464	Hexoză-N-acetil-hexozamină
"	737	NANA-NGNA sau NGNA-NANA
"	767	NGNA-NGNA

*Abrevieri: R, rinichi; S, splină

Spectrometria de masă a ionilor negativi formaţi prin bombardare cu atomi rapizi (BAR) (fast atom bombardment, FAB) a fost deasemenea utilizată pentru studiul izomeriei gangliozidelor. Această tehnică este o formă de ionizare mai blândă şi în consecinţă dă modele mai simple decât metoda impactului cu electroni. Principalele peak-uri rezultă din ruperea legăturilor glicozidice (D. Klein şi colab., 1987) (Fig. 9).

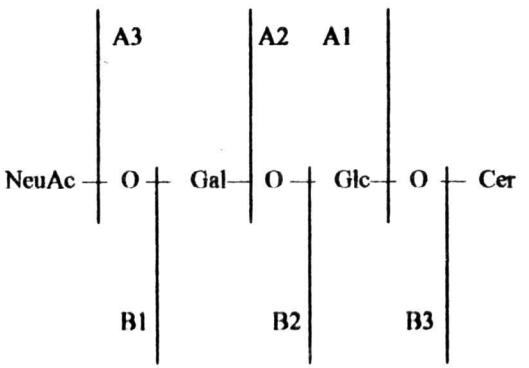


Fig. 9.Fragmentarea gangliozidului GM3 la SM-BAR.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Tabelul 19 prezintă masele acestor ioni.

Tabelul 19. Ionii negativi caracteristici ai gangliozidului GM3 în spectrometria de masă BAR.

Glicolipid	Acid gras	M1	A3	A2	A1	B3	B2	B1
GM3	24:0	1263	972	810	648	632	470	308
	24:1	1261	970	808	646			
	22:0	1235	944	782				
	16:0	1151	860	698				

Metoda SM-BAR a fost aplicată la elucidarea structurii şi a diversităţii moleculare a GSL acide din ţesut testicular de cocoş (D. P. Iga, Silvia Iga, T. Larsson, J. Ångström, B. Soussi, O. Rakotonirainy, Halina Miller-Podraza, Glycoconjugate J. 15, 1111-1114 (1998): Acidic glycosphingolipids of cock testis elucidated by mass spectrometry and NMR spectroscopy). Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 20.

Tabelul 20.Ionii moleculari majori identificaţi în spectrele de masă BAR a GSL acide purificate din ţesut testicular de cocoş. (Ionii (m/z) sunt prezentaţi în ordinea descrescătoare a abundenţei. Datele din paranteză indică structurile mai puţin probabile sau mai puţin abundente.)

Glicolipidul identificat*	m/z**	Compoziţia în ceramide
sulfatid	888,5	d18:1, 24:1
SO_3-3GalßCer	890,5	d18:1, 24:0
	886,6	d18:1, 24:2 sau
		d18:2, 24:1
	862,6	d18:1, 22:0
	916,6	d18:1, 26:1
	778,5	d18:1, 16:0
	806,5	d18:1, 18:0
	834,6	d18:1, 20:0
GM4	1089,8	d18:1, h22:0, NeuAc
NeuAc(NeuGc)α3GalßCer		(d18:1, 22:0, NeuGc)
		(t18:0, 22:1, NeuAc)
	1061,7	d18:1, h20:0, NeuAc
		(d18:1, 20:0, NeuGc)
		(t18:0, 20:1, NeuAc)
	1115,8	d18:1, h24:1, NeuAc)
		(d18:1, 24:1, NeuGc)
	1087,8	d18:1, h22:1, NeuAc
		(d18:1, 22:1, NeuGc)
	1045,7	d18:1, 20:0, NeuAc
	1017,7	d18:1, 18:0, NeuAc

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

GM3	1221,6	d18:1, 20:0, NeuGc
NeuAc(NeuGc)α3Galß		şi/sau
4GlcßCer		d18:1, h20:1, NeuAc
	1207,7	d18:1, 20:0, NeuAc
	1263,8	d18:1, 24:0, NeuAc
	1179,7	d18:1, 18:0, NeuAc
	1237,6	d18:0, 18:0, NeuAc
	1235,8	d18:1, 22:0, NeuAc
1151,7		d18:1, 16:0, NeuAc
GD3	1554,9	d18:1, 24:0, NeuAc
NeuAc(Gc)α8NeuAc(Gc)	1576,9	(M-2H+Na)
α3Galß4GlcßCer	1592,9	(M-2H+K)
	1498,9	d18:1, 20:0, NeuAc
	1520,9	(M-2H+Na)
	1536,9	(M-2H+K)
	1526,9	d18:1, 22:0, NeuAc
	1470,9	d18:1, 18:0, NeuAc

*Structurile provin din interpretarea combinată a spectrelor de masă şi a spectrelor RMN.
**Valorile corespund la M-H, dacă nu se indică altceva

2.3.6. Elaborarea unui model matematic asupra diversităţii moleculare a gangliozidelor

Evaluarea diversităţii moleculare prin formule matematice constituie o problematică consacrată a Chimiei Organice şi Biochimiei. Această problematică vizează în primul rând cunoaşterea varietăţii moleculare a unui anumit compus, implicit a aspectelor entropice care-l descriu. În al doilea rând, diversitatea moleculară se corelează cu interacţii moleculare între compuşi identici sau diferiţi, în cadrul activităţii biologice. Corelarea diversităţii moleculare a unor clase diferite de compuşi biologic activi s-a dovedit extrem de rodnică pentru Chimie şi Bilogie. Astfel s-a presupus că nucleotidele sunt grupate funcţional, în cadrul ADN şi ARN, ca triplete, prin aranjamente cu repetiţii. Raţionamentul era menit să explice codificarea a 20-22 de aminoacizi cu ajutorul a patru baze azotate (G. Gamow şi colab., 1955). Glucidele sunt caracterizate de şapte particularităţi structurale majore: (i) epimeria, incluzând formele D şi L; (ii) secvenţa liniară a miezului şi secvenţa ramurilor; (iii) mărimea inelului; (iv) configuraţia anomeră; (v) punctele de legare; (vi) punctele de ramificare; (vii) monomerul terminal reducător. Toate acestea contribuie la existenţa unui număr mare de izomeri cu catenă scurtă care pot fi recunoscuţi de către proteine. Ca regulă, proteinele care leagă glucidele recunosc un oligomer constând din maximum şase monomeri. S-a propus că în cuprinsul unei secvenţe hexazaharidice constând din monomeri diferiţi, sunt posibile aproximativ de $1,05 \times 10^{12}$ structuri. Din contra, un set de şase aminoacizi diferiţi poate genera numai 46.655 structuri diferite, cu peste şapte ordine de mărime mai puţin (R. Laine, 1994). A fost publicat un tabel de calcul din care rezultă 720 izomeri pentru un trizaharid, 34.560 pentru un tetrazaharid şi 2.144.640 pentru un pentazaharid (R. Schmidt, 1986). Laine şi colab., (1988) au elaborat o formulă de calcul, incluzând mărimea inelelor, pentru un pentazaharid reducător cu catenă liniară constând din unităţi diferite:

$$D = n! \times 2_a^n \times 2_r^n \times 4^{n-1}$$

unde D este numărul de izomeri; n, numărul de monozaharide; 2_a^n este factorul datorat anomeriei; 2_r^n este factorul dependent de mărimea inelului; 4^{n-1} este factorul care reprezintă

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

poziţiile de legare. Rezultă astfel pentru un pentazaharid un numar de 31.457.280 izomeri (R. Laine şi colab., 1988).

Gangliozidele au constituit deasemenea obiectul evaluării diversităţii moleculare. Gangliozidele constituie structuri de forma:

$$AiBj(\mu 1)_a\ (\mu 2)_b(\mu 3)_c \ldots\ (\mu p)_v$$

unde: A1, A2, A3, ..., Am
B1, B2, B3, ..., Bn
μ1, μ2, μ3,..., μp
sunt, respectiv, trei tipuri de molecule constituente ale gangliozidelor cu diversitatea indicată. Se precizează că:

i=1,2, ..., m
j=1,2, ..., n

Este posibil ca:
a=0,1,2, ..., q
b=0,1,2, ..., q
.....
v=0,1,2, ..., q

dar în mod obligatoriu: a+b+ ... +v=q.

În aceste condiţii diversitatea moleculară D a unui astfel de GSL de calculează cu ajutorul formulei (D. P. Iga şi Silvia Iga, 1993):

$$D = m \times n \times p^q \qquad (1)$$

Gangliozidele constau din trei tipuri de constituenţi: o moleculă de bază sfingoidă (BCL), o moleculă de AG şi o catenă oligozaharidică constând din 1-20 molecule de glucide neutre (care sunt aceleaşi pentru gangliozidele unei serii) şi 1-5 molecule de AS (R. W. Ledeen şi R. K. Yu, 1982). Baza sfingoidă este un aminoalcool cu catenă lungă, la gruparea amino fiind ataşată o grupare acidă printr-o legătură amidică, formând un ceramid. Catena oligozaharidică este ataşată la C-1 a BCL printr-o legătură ß-glicozidică a Glc (în gangliozide ca GM3, GM2, GM1, etc.) sau a Gal, în gangliozidul GM4. O caracteristică unică a gangliozidelor este diversitatea lor care este o consecinţă a complexităţii lor structurale. BCL variază ca lungime a catenei (14-20 atomi de carbon), ca saturare (saturate sau nesaturate, conţinând 1-3 legături duble) şi/sau ca hidroxilare (4-hidroxisfinganina, trihidroxi 5-octadecasfingenina (S. Gasa şi A. Makita, 1980) etc.), AG poate fi saturat, mononesaturat, polinesaturat şi/sau hidroxilat. Variaţia acestor factori depinde de tipul celular, dietă, vârstă. AS poate fi acid N-acetil neuraminic (NANA) sau N-glicoloilneuraminic (NGNA) (K. Tadano şi I. Ishizuka, 1982; M. Iwamori şi colab., 1984; M. Sekine şi colab., 1984). Mărimile din formula aplicată la gangliozide au următoarele semnificaţii: D, m, n şi p reprezintă numărul de specii moleculare de gangliozide, AG, BCL şi, respectiv, AS; q este numărul de resturi AS per moleculă de gangliozid, prin urmare q=1 pentru monosialo-, 2 pentru disialo-etc., 5 pentru pentasialogangliozide. Se poate considera că diversitatea moleculară D este determinată de doi factori: un factor este produsul m x n iar celălalt este p^q. Factorul m x n indică numărul de specii moleculare de ceramide incluse într-un gangliozid. Se pune întrebarea dacă numărul de forme calculat este identic cu numărul real. Watanabe şi colab., (1979) au găsit că gangliozidul GM1b din membrana eritrocitară umană conţine 17 AG şi o singură BCL, octadecasfingenina. Fracţiunea hidrofobă a GD1a din membranele fantomelor eritrocitare de la şobolan este formată din şapte AG şi o BCL, 4-sfingenina (M. Iwamori şi colab., 1984). Este evident că în aceste două cazuri numărul de ceramide ale gangliozidelor respective este egal cu

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

numărul calculat de tipuri: 17, respectiv, 7. În celelalte cazuri sunt necesare cercetări suplimentare pentru a confirma sau îmbunătăți formula propusă. Tabelul 21 prezintă câteva rezultate obținute prin calcul. Evaluarea probabilistică a apariției unui anumit ceramid nu trebuie corelată cu eventuala sinteză preferențială a acestuia de către un anumit țesut. Calculând numărul de ceramide, formula (1) este valoroasă pentru determinarea nivelului entropic al ceramidelor.

Factorul p^q determină numărul de specii moleculare a unui gangliozid, care depinde de numărul , tipul și modul de aranjare a resturilor de AS în molecula gangliozidului. Pentru monosialogangliozidele provenite din splină și rinichi de cabaline, care conțin NANA sau NGNA, valoarea p^q este $2^1=2$; ambele forme au fost găsite pentru fiecare din gangliozidele: GM3, GM2, GM1a. Disialogangliozidele conținând NANA și/sau NGNA dau pentru p^q valoarea $2^2=4$. Patru gangliozide GD1a și patru gangliozide GD1b au fost izolate și caracterizate din organele cabalinelor (S. Gasa și A. Makita, 1980). Trisialogangliozidele care includ două tipuri de AS, NANA și NGNA, dau pentru p^q valoarea $2^3=8$; șapte gangliozide GT1b au fost identificate în medulosuprarenala bovină, din care șapte au fost izolate și caracterizate . Cea de-a opta formă nu a fost exclusă de către autorii respectivi (T. Ariga și colab., 1983). Formula mai sus-menționată prezice $2^4=16$ gangliozide pentru un pentasialogangliozid, ambele conținând două tipuri de AS (NANA și/sau NGNA). Toate aceste structuri pot fi prevazute dar sunt necesare cercetări suplimentare pentru izolarea și caracterizarea lor.

Tabelul 21. Numărul de tipuri de ceramide din constituția unor gangliozide în funcție de diversitatea AG și BCL.

Gangliozid, sursă	Nr. de AG m	Nr. de BCL n	Nr. de ceramide, mxn	Indicația bibliografică
GM1b, membrana eritrocitară umană	17	1	17	K. Watanabe și colab., 1979
GD1a, fantome eritrocitare, șobolan	7	1	7	M. Iwamori și colab., 1984
GM3, creier de vițel	8	4	32	S. Sonino și colab., 1990
GQ1c, creier de cod	9	3	27	S. Ando și R. K. Yu, 1979
GQ1b, creier uman	4	5	20	ibid.
GM4, rinichi de șobolan	11	2	22	K. Tadano și I. Ishizuka, 1982
GM4, suprarenală de cobai	20	4	80	M. Sekine și colab., 1984
GM3, suprarenală de cobai	10	4	40	ibid.
GM3, rinichi de cabaline	17	10	170	S. Gasa și A. Makita, 1980
GM3, splină de cabaline	15	8	120	ibid.
GM1a, rinichi de cabaline	17	10	170	ibid.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

GM1a, splină de cabaline	17	9	153	ibid.
GD1a, rinichi de cabaline	14	10	140	ibid.
GD1a, splină de cabaline	15	11	165	ibid
GD1b, splină de cabaline	15	11	165	ibid.

2.3.6.1.Sistematizarea pe computer a structurilor gangliozidelor

Formula propusă precum şi cunoaşterea compoziţiei unui gangliozid în AG, BCL şi AS permite evaluarea diversităţii moleculare a gangliozidului. Numărul total D al tuturor speciilor moleculare de gangliozide include formele unice şi formele izomere iar acestea pot fi grupate prin intermediul unui program de computer, după cum s-a indicat în Tabelul (ordinea gangliozidelor este aceeaşi ca în Tabelul 21).

Tabelul 22. Sistematizarea pe computer a diversităţii moleculareа a gangliozidelor

Gangli-ozid*	m	n	p	D	f.u.**	Grupe de													
						2I	3I	4I	5I	6I	7I	8I	9I	10I	11I	12I	13I	15I	16I	18I
GM1b	17	1	1	17	17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GD1a	7	1	1	7	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GM3	8	4	1	32	6	8	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GQ1c	9	3	1	27	11	5	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GQ1b	4	5	1	20	4	5	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GM4	11	2	1	22	20	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GM4	20	4	1	80	20	4	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GM3	10	4	1	40	10	10	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GM3	17	10	2	340	27	31	15	6	7	5	4	6	1	2	-	1	-	-	-	-
GM3	15	8	2	240	35	21	16	12	9	1	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-
GM1a	17	10	2	340	27	27	18	9	3	6	3	3	7	1	-	-	-	-	-	-
GM1a	17	9	2	306	28	29	15	8	4	5	5	6	-	1	-	-	-	-	-	-
GD1a	14	10	2	560	34	26	15	7	8	14	7	8	3	1	4	1	2	3	-	-
GD1a	15	11	2	660	29	19	30	5	3	10	5	5	9	3	3	6	3	4	-	1
GD1b	15	11	2	660	30	20	26	5	7	14	5	5	7	5	1	6	2	4	1	-

* Succesiunea gangliozidelor este aceeaşi ca în Tabelul 14; ** f.u, forme unice; *** I, izomeri

Pe de altă parte speciile moleculare ale unui gangliozid dat pot fi analizate în termeni de saturare (saturate, mono- sau nesaturate) şi/sau hidroxilare (conţinând una, două sau trei grupări hidroxil distinctive ale NGNA, hidroxi-AG, sau fitosfingozinei). Iwamori şi colab., (1984) au observat diferenţe distincte între speciile moleculare de GM3 din intestin de şobolan. Astfel în regiunea gangliozidului GM3 au fost localizate trei spoturi, la CSS. Componentele extreme au fost izolate cromatografic şi s-a constatat ca banda superioară conţinea GM3 format din NANA, 4-sfingenina şi non-hidroxi-AG în timp ce banda inferioară a fost caracterizată ca GM3 cu NGNA, fitosfingozină şi 2-hidroxi-AG (M. Iwamori şi colab., 1984). Este extrem de probabil că gangliozidul GM3 din banda medie (nestudiat de către autorii respectivi) conţine una şi/sau două grupări hidroxil distinctive.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

S-a arătat că anticorpii heterofili Hanganutziu-Deicher reacționează specific cu gangliozidele conținând NGNA (K. Watanabe și colab., 1979). Se poate presupune că nu numai numărul de resturi NGNA per moleculă de gangliozid dar și aranjarea lor pot influența intensitatea reacției dintre anticorpi și gangliozide.

2.3.6.2. Forma finală și semnificația ecuației

Identificarea și caracteizarea tuturor speciilor moleculare de ceramide conținute într-un gangliozid ar putea explica biosinteza și reglarea acestuia. Un coeficient b ar trebui introdus în ecuația (1), pentru a face neobligatorie existența tuturor speciilor moleculare calculate de ceramide determinate de mAG și nBCL. Prin urmare :

$D=(b \times m \times n) \times p^q$, unde $0 < b \leq 1$.

Este necesară bineînțeles clarificarea compatibilității dintre un AG și o anumită BCL.

S-a demonstrat că gangliozidele în calitate de componente ale membranei plasmatice a celulelor animale, sunt ancorate în membrana celulară prin fracțiunea lor hidrofobă (ceramidul) în timp ce fragmentul hidrofil oligozaharidic proemineză în spațiul extracelular (G. A. Nores și colab., 1987; P. Rock și colab., 1990; S. Hakomori, 1993). În același timp modelul GSL este caracteristic tipului celular, stadiului de diferențiere și transformării oncogene (K. Sandhoff și P. Leinekugel, 1990; S. Hakomori, 1990; A. Olivera și S. Spiegel, 1992). În acest sens factorul (bx m x n) este o caracteristică a zonei hidrofobe a membranei, în timp ce factorul p^q este o caracteristică a modelului celular.

Ecuatia (1) servește la calcularea și sistematizarea *tuturor* structurilor unui gangliozid sau GSL. După cum se observă din Tabelul 14, o diversitate moleculară remarcabilă prezintă gangliozidele GM3, GM1a, GD1a și GD1b. De ex., numărul total de structuri posibile ale gangliozidului GD1a din rinichi de cabaline este egal cu 560. Acestea au fost sistematizate, cu ajutorul unui program de calculator, astfel: 34 sunt unice iar celelalte sunt distribuite pe grupe de izomeri, numărul maxim de izomeri fiind 15 (trei grupe). Fiecare structură este caracterizată prin tipul de AG (lungimea catenei, numărul de legături duble, numărul de grupări hidroxil), prin tipul de BCL (caracterizată prin aceeași parametri) și de AS. În cazul ultimului compus s-au luat în calcul numai două posibilități: NANA și NGNA ; dar trebuie precizate, în plus, glucidele neutre substituite (Gal II sau Gal IV), precum și modul de legare a resturilor de AS: între ele sau pe glucidul neutru.

2.4. Metode actuale utilizate la elucidarea structurii glicosfingolipidelor

Primele metode utilizate la elucidarea structurii GSL erau aproape exclusiv chimice și biochimice. Ulterior, metodelor chimice și biochimice li s-au alăturat o serie de metode fizice, dintre care cele mai utilizate astăzi sunt spectroscopia RMN și spectrometria de masă, ambele într-o diversitate de variante.

2.4.1. Structura fragmentului oligoglucidic

Elucidarea structurii oligoglucidice implică următoarele aspecte:

- compoziția glucidică: cunoașterea naturii chimice a glucidelor constituente și a raportului lor molar;
- legăturile glicozidice ale fiecărei unități monoglucidice precum și monoglucidul care se leagă la agliconul lipidic;
- configurația fiecărei legături glucidice.

2.4.1.1. Compoziția glucidică

În vederea cunoașterii compoziției glucidice, glicolipidul este supus metanolizei cu un amestec de metanol anhidru și HCl; prin acest tratament se rup toate legăturile glucidice iar

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

resturile monoglucidice devin metil-glicozizi. Metil-glicozizii sunt supuşi unei reacţii de trimetilsililare, cu un amestec de piridină, trimetilclorsilan şi hexametildisilazan. Metilglicozizii trimetilsililaţi sunt analizaţi prin CGL (B. L.Slomiany şi A. Slomiany, 1978; K. Tadano şi I. Ishizuka, 1982; K. Nagai şi colab., 1989).

Rezultate suplimentare privind compoziţia glucidică rezultă din experimente de permetilare-acetoliză (v. mai jos).

2.4.1.2. Determinarea secvenţei fragmentului oligoglucidic

Determinarea legăturilor glicozidice ale fiecărei unităţi monoglucidice precum şi monoglucidul care se leagă la agliconul lipidic se realizează prin mai multe metode:
- permetilare-acetoliză;
- spectrometrie de masă prin metoda bombardării cu atomi rapizi (SM-BAR);
- analiza enzimatică.

Permetilare-acetoliză. Metoda se bazează pe faptul că legăturile glicozidice sunt mai labile la hidroliza acidă decât celelalte legături chimice ale gangliozidului. Procedeul a fost iniţiat de către Kuhn şi Egge (1963) şi îmbunătăţit de către Hakomori (1964). Permetilarea-acetoliza serveşte la determinarea poziţiilor legăturilor glicozidice ale glicosfingolipidelor.

Permetilarea este realizată cu un exces de iodură de metil în prezenţa carbanionului dimetilsulfinil; ultimul rezultă din hidrură de sodiu şi dimetil sulfoxid. Produsul permetilat este hidrolizat cu acid formic sau acid acetic în condiţii în care se rup numai legăturile glicozidice iar monozaharidele parţial metilate sunt reduse cu borohidrură de Na şi acetilate, astfel că rezultă alditol acetaţi parţial metilaţi. Reacţia de reducere, prin care grupările carbonilice sunt transformate în grupări hidroxil, simplifică compoziţia amestecului prin eliminarea anomeriei α,ß. Componentele amestecului sunt identificate prin gaz-cromatografie sau prin tandemul gaz-cromatografie - spectrometrie de masă. Îndeosebi structura monosialo- şi disialo-izomerilor gangliozidelor a fost stabilită prin permetilare-acetoliză.

Etapele acestei metode sunt următoarele:
- glicolipidul este metilat exhaustiv cu un amestec de iodură de metil şi hidrură de sodiu în dimetilsulfoxid (S. Hakomori, 1964; K. Stellner şi colab., 1987);
- compusul permetilat este hidrolizat cu acid acetic sau cu acid formic şi rezultă monoglucide metilate parţial;
- monoglucidele parţial metilate sunt reduse, cu borohidrură de sodiu, obţinându-se alditoli partial metilaţi; astfel, amestecul se simplifică prin evitarea α,ß anomeriei;
- alditolii parţial metilaţi sunt acetilaţi la grupările hidroxil libere, produşii de reacţie fiind alditoli acetilaţi, parţial metilaţi;
- alditolii acetilaţi parţial metilaţi sunt analizaţi cu tandemul GC-SM.

Interpretarea rezultatelor. În etapa de metilare se metilează toate grupările hidroxil libere. Ca regulă generală, un număr relativ mare de grupări metil înseamnă implicarea glucidului în puţine legături aglicon.

1.Cerebrozidul (Galß1-1'Cer) va da un glucitol metilat în poziţiile: 2,3,4,6; mai multe astfel de molecule de glucitol (identice sau diferite) per moleculă de glicolipid înseamnă tot atâtea capete terminale.

2.Un glucid implicat în două legături glicozidice (una proprie şi una ca aglicon) va duce la un hexitol trimetilat. De ex sulfatidul (sulfo-3GalCer) va da un glucitol metilat în poziţiile: 2,4,6. În această etapă sunt posibili o serie de izomeri (v. Tabelul 23). Un glucid implicat în trei legături glicozidice (una proprie şi două ca aglicon) va duce la un hexitol dimetilat; glucidul respectiv constituie punct de ramificaţie şi aceşti derivaţi trebuie corelaţi cu derivaţii tetrametilaţi.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Tabelul 23. Alditoli acetilaţi parţial metilaţi obţinuţi în funcţie de gradul de substituţie.

Rest glucidic şi/sau GSL	Alditol acetat parţial metilat
GalCer	2,3,4,6-tetra-O-Me 1,5-di-O-Ac galactitol (1)
Sulfo-3GalCer	2,4,6-tri-O-Me 1,3,5-tri-O-Ac galactitol (2a)
Gal II din GA2 (asialo GM2)	2,3,6-tri-O-Me 1,4,5-tri-O-Ac galactitol (2b)
2-O-Acil gras-GalCer	3,4,6-tri-O-Me 1,2,5-tri-O-Ac galactitol (2c)
6-O-Acil gras-GalCer	2,3,4-tri-O-Me 1,5,6-tri-O-Ac galactitol (2d)
Gal II din GM2	2,6-di-O-Me 1,3,4,5-tetra-O-Ac galactitol (3a)
Gal II din antigenul B MAEPn-6 \ -GalNAc1-3Gal1-4Glc- / Gal1-2 (fragment dintr-un GSL din *C. a. turbinatum)*	4,6-di-O-Me 1,2,3,5-tetra-O-Ac galactitol (3b) 4-O-Me 1,2,3,5,6-penta-O-Ac galactitol (4)

După cum se observă din Tabelul 23, compuşii 2a, 2b, 2c, 2d, sunt izomeri; 3a şi 3b sunt desemenea izomeri; obţinerea compusului 4 denotă existenţa a două ramificaţii pe restul glucidic respectiv. Trebuie precizat că o evaluare corectă a derivatului glucidic necesită utilizarea tuturor alditol acetaţilor parţial metilaţi posibili. O aplicaţie a celor prezentate mai sus o constituie elucidarea structurii gangliozidului O-Ac-GT1b din creier de şoarece (R. Ghidoni şi colab., 1980) (Tabelul 24).

Tabelul 24. Derivaţi glucidici obtinuţi din O-Ac-GT1b, din GM1 rezultat prin hidroliza enzimatică a acestuia şi din Gg4-Cer rezultat prin hidroliza acidă.

Derivat glucidic	Raport molar		
	OAc-GT1b	GM1	Gg4Cer
1,4,5-tri-O-acetil-2,3,6-tri-O-metilglucitol	1	1	1
1,4,5-tri-O-acetil-2,3,6-tri-O-metilgalactitol	-	-	1
1,3,4,5-tetra-O-acetil-2,6-di-O-metilgalactitol	1	1	-
1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metilgalactitol	-	1	1
1,3,5-tri-O-acetil-2,4,6-tri-O-metilgalactitol	1	-	-
4,6-di-O-metil-1,3-di-O-trimetilsilil-2-metilacetamido-2-deoxi-galactoză	+	+	+

Metoda permetilare-acetoliză a permis clarificarea izomeriei gangliozidelor (v. acolo).

2.4.1.3. Configuraţia anomeră

Primele metode utilizate pentru determinarea anomeriei au fost cele chimice şi cele biochimice. O metodă chimică a constituit-o transformarea α-glucopiranozil-1-fosfatului într-un fosfat ciclic, spre deosebire de ß-glucopiranozil-1-fosfat care nu dă această reacţie. Metodele biochimice se bazează pe specificitatea de substrat a exoglicozil-hidrolazelor: α-Hidrolazele

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

clivează numai legături α-glicozidice iar ß-hidrolazele numai legături ß-glicozidice. Metoda este descrisă mai amănunţit în capitolul despre Izomeria gangliozidelor (v. acolo). O metodă rapidă, sensibilă şi comodă pentru determinarea anomeriei o constituie spectroscopia RMN (v. acolo).

Determinarea anomeriei prin oxidare cu acid cromic. O metodă surprinzătoare şi cunoscută doar parţial, utilizată la determinarea anomeriei, este oxidarea cu acid cromic (R. A. Laine şi O. Renkonen, 1975; M. Nakano şi W. Fischer, 1977). S-a constatat că monoglucidele implicate în legături ß sunt distruse de către acidul cromic în timp ce monoglucidele ce prezintă legături α sunt rezistente. Se procedează în felul următor: glicolipidul este acetilat exhaustiv cu piridină-anhidridă acetică şi oxidat, în condiţii bine determinate, cu anhidridă cromică; compuşii reziduali sunt recuperaţi şi analizaţi.

2.4.2. Spectroscopia RMN

Spectroscopia de rezonanţă magnetică protonică a jucat un rol de frunte în analiza structurală a GSL deoarece metoda este rapidă, cantitativă, nedestructivă şi sensibilă. Iniţial s-au obţinut numai rezultate parţiale privind structura primară a gangliozidelor (J. F. G. Vliegenthart, 1980; S. Gasa şi colab., 1981; T. A. W. Koerner şi colab., 1982). Dificultatea provine din problematica rezoluţiei: toate rezonanţele metinice ale inelelor oligozaharidelor, cu excepţia rezonanţelor anomere, se situează în cuprinsul valorii de 1 ppm; aşa-zisele rezonanţe ascunse constituie un aspect comun tuturor oligozaharidelor. O soluţie generală şi completă a rezonanţelor ascunse a provenit pe două căi. Pe de o parte au apărut spectrometre RMN cu câmp foarte intens (500 MHz, 600 MHz); pe de altă parte a apărut spectroscopia homonucleară cu ecou de spin corelată cu J (2-D-SECSY), dezvoltată de către Ernst şi colab (W. P. Aue şi colab., 1976; K. Nagayama şi colab., 1980); metoda a fost aplicată, concomitent, la analiza polipeptidelor (G. Wagner şi colab., 1981), a unor derivaţi monoglucidici (M. A. Bernstein şi colab., 1982) şi a unor polihexozil-ceramide (tri-HexCer: J. H. Prestegard şi colab., 1982; penta-HexCer: J. Dabrowski şi P. Hanfland, 1982). A urmat atribuirea completă a spectrelor protonice a unor monosialo-gangliozide, a asialo-derivaţilor lor, prin utilizarea metodei RMN 2-D-SECSY la 500 MHz homonucleare (T. A. W. Koerner şi colab., 1983). S-a demonstrat astfel că prin analiza subspectrelor generate prin metoda 2-D-SECSY se poate determina compoziţia în monozaharide, configuraţiile anomere şi structura aglicon a gangliozidelor. Pentru îndepărtarea protonilor mobili, probele au fost suspendate în D_2O, solubilizate prin sonicare şi adaus de Me_2SO-d_6 şi liofilizat. Reziduil rezultat a fost dizolvat prin sonicare într-un amestec proaspăt de Me_2SO-d_6 - D_2O (98:2 v/v) şi Me_4Si, pentru a obţine concentraţii ale probelor 2-3 mM. Trebuie subliniat că amestecul Me_2SO-d_6 -D_2O este un solvent foarte bun atât pentru gangliozide cât şi pentru asialo-gangliozide; totodată, permite elaborarea unor spectre bine dispersate. Mai trebuie adăugat că peak-urile solventului sunt mult depărtate, spre upfield, de rezonanţele anomerilor. Spectrele monodimensionale integrate au fost obţinute pe o lărgime spectrală de 5000 Hz (0-10 ppm), un timp de ciclu de 10 s şi 100-200 scanări. Pentru spectroscopia bidimensională a fost preferată spectroscopia SECSY, în comparaţie cu COSY, deoarece prima este mai avantajoasă în situaţii când diferenţele dintre frecvenţele de rezonanţă a perechilor de nuclei cuplaţi constituie o mică fracţiune din lărgimea spectrală totală. Acesta este, îndeosebi, cazul gangliozidelor, la care diferenţele dintre deplasările chimice ale protonilor inelari sunt întotdeauna mai mici de 2 ppm. Spectrul RMN monodimensional (1-D) al gangliozidului GM2 la 500 MHz în soluţie Me_2SO-d_6 - D_2O are următoarele caracteristici: (1) dispersia spectrală este aproape completă; (2) mai multe clase de protoni sunt rezolvate complet şi pot fi atribuite pe baza deplasărilor chimice şi a intensităţilor: (a) în zona upfield a spectrului sunt protonii metilici alkil şi acetamido, la 0,85 şi, respectiv, 1,7-1,9 ppm; (b) protonii alkil, alil, α-carbonil şi H-3 a AS sunt, respectiv, la: 1,23, 1,93, 2,02, 1,4-2,8 ppm; (c) în zona downfield a spectrului sunt protonii H-1 ai oligozaharidelor

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

(protonii anomeri) şi protonii metinici olefinici la 4,0-5,0 şi, respectiv, 5,2-5,6 ppm; (3) regiunea dintre 3 şi 4 ppm este rezolvata mai puţin clar.

NOTĂ. Structura, simbolizarea şi numerotarea gangliozidelor şi asialo-gangliozidelor se bazează, în cadrul discuţiei despre spectroscopia RMN, pe următoarele:

1.A fost utilizat, ca referinţă, un ceramid format dintr-o BCL ((4E, 2S, 3R) 1,3-dihidroxi 2-amino ikosa -4-sfingenina)) şi dintr-un AG constând din 18 atomi de C (acidul stearic). Atomii de carbon ai ceramidului au fost numerotaţi astfel: primii şase atomi de C ai BCL cu cifrele 1-6, primii trei atomi de C ai AG cu cifrele 7-9, atomii de C şapte-şaisprezece ai BCL şi atomii de C patru-paisprezece ai AG cu cifra 10; ultimii patru atomi, atât ai BCL cât şi AG, au fost desemnaţi cu cifrele 11-14. Ceramidul în ansamblu este desemnat prin R (Fig. 10).

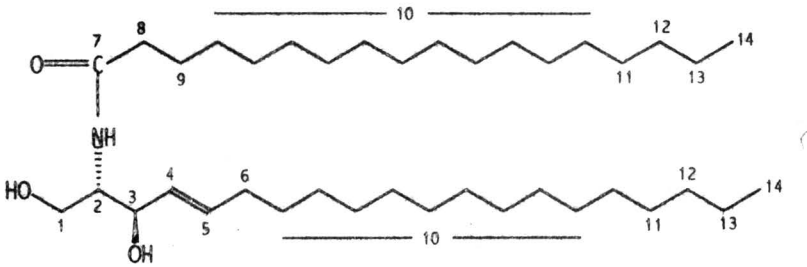


Fig. 10.Simbolizarea atomilor ceramidului (desemnat prin R) din cadrul GSL (v. şi Fig. următoare)

2.Poziţia glucidelor neutre în cadrul gangliozidelor a fost indicată prin cifre romane începând dinspre ceramid; atomii de C ai fiecărui glucid sunt numerotaţi cu cifre arabe (1-6) iar atomii grupării acetil a GalNAc cu cifrele 7 şi 8 (7 la atomul de C carboxilic) (Fig. 11).

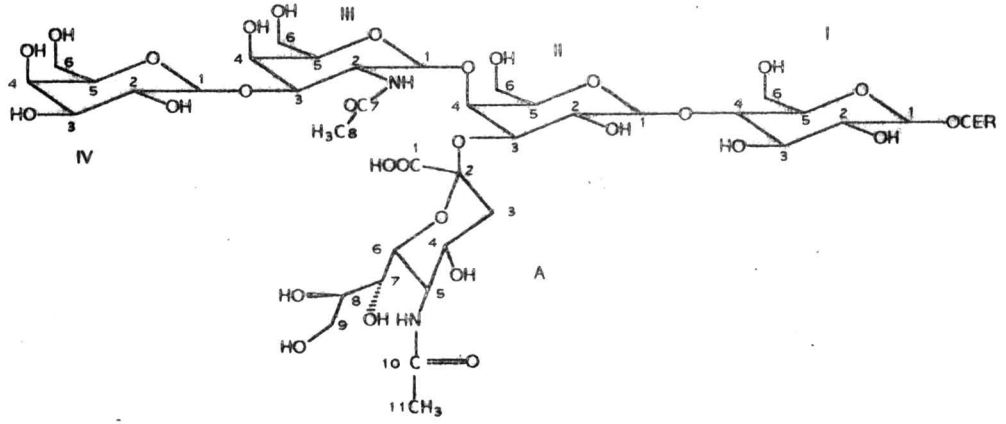


Fig. 11.Structurile, simbolizarea şi numerotarea gangliozidelor, asialo-derivaţilor lor, glucozil-ceramidului şi acidului N-acetil-α-neuraminic. Pentru numerotarea ceramidului vezi Fig precedentă.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

3.Restul de AS este desemnat cu litera A, atomii de C ai AS cu cifrele 1-9, atomul de carbon carboxilic al gruparii acetil cu 10 iar gruparea metil cu 11.
4.Cu ajutorul regulilor de mai sus, GSL sunt desemnate astfel: GlcCer: R, I; GalCer: R, II; LacCer: R, I, II; GA2: R, I, II, III; GA1: R, I, II, III, IV; GM4: R, II, A; GM3: R, I, II, A; GM2: R, I, II, III, A; GM1: R, I, II, III, IV, A; NeuAc: A

Spectrul upfield. Deplasările chimice pentru rezonanţele protonilor metilici sunt prezentate în Tabelul 25. Rezonanţa grupării metil alkilice (R-14) a fost atribuită datorită deplasării upfield extreme (0,85 ppm).

Tabelul 25. Deplasările chimice şi rapoartele de integrare ale rezonanţelor protonilor metilici ai gangliozidelor, asialo-derivaţilor lor şi acidului N-acetil neuraminic.

Compus	Deplasările chimice ale protonilor (ppm)[a]			Raportul de integrare[b]	
	A-11	III-8	R-14	A-11/R-14	III-8/R-14
LacCer			0,852		
GA2		1,884	0,852		0,50
GA1		1,829	0,853		0,50
GM4	1,888		0,853	0,50	
GM3	1,888		0,853	0,50	
GM2	1,875	1,777	0,854	0,50	0,50
GM1	1,878	1,753	0,853	0,50	0,50
NeuAc[c]	1,881				

a, eroare ±0,001 ppm; b, eroare ±0,05; c, datele au fost obţinute pe un amestec de α- şi ß-anomeri ai NeuAc.

Valoarea este identică cu rezonanţa grupării metil alchilice a altor GSL. Rezonanţa grupării metil a restului GalNAc (III-8) din GA2 si GA1 şi a restului NeuAc (A-11) din GM4 şi GM3 este deasemenea uşor de atribuit deoarece structurile respective posedă o singură grupare acetamido metil şi prin urmare prezintă o rezonanţă unică în regiunea 1,7-1,9 ppm a spectrului. Deplasările chimice ale celor două grupări metil III-8 din GA2 şi GA1 sunt identice cu cele găsite pentru resturile GalNAc şi GlcNAc din GSL din seria globo sau lacto. Deplasarea chimică 1,89 ppm a grupării metil A-11 din GM4 şi GM3 este foarte apropiată de aceea a NeuAc în acelaşi solvent. Ambele grupări metil, A-11 şi III-8, sunt prezente în GM2 şi GM1 şi foarte apropiate de regiunea metil acetamido. Semnalul, din regiunea downfield, de la 1,88 ppm a fost atribuit lui A-11, pe baza spectrului gangliozidului GD1a, care conţine două rezonanţe ale grupării metil la 1,88 ppm cauzate de cele două grupări acetamido. Spectrele RMN ^{13}C au confirmat aceste rezultate.

Deplasările chimice pentru protonii metilenici upfield ai unor compuşi din Tabelul 25 sunt prezentate în Tabelele 26 şi 27. Rezonanţele metilenice alchil (1,23 ppm), alil (1,93 ppm) ai α-carbonil (2,02 ppm), din compuşi cu structură relativ complicată (de la LacCer până la GM1,

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Tabelul 26. Deplasările chimice[a] ale protonilor metilenici şi metinici din ceramidul unor GSL

Compus	Deplasările chimice ale protonilor (ppm)								
	H-1a	H-1b	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-8	H-10[b]
GlcCer	3,469	3,922	3,782	3,898	5,366	5,548	1,937	2,030	1,20
GalCer[c]	3,451	3,937	3,784	3,918	5,369	5,562	1,936	2,038	1,25
	3,539	3,909	3,820	4,001	5,383	5,582	1,936	3,820	1,25
LacCer[d]	3,478	3,957	3,751	3,30[e]	1,232	1,232	1,232	2,049	1,232
GA2	3,442	3,987	3,768	3,870	5,346	5,535	1,932	2,021	1,233
GA1	3,434	3,986	3,764	3,869	5,347	3,534	1,933	2,022	1,233
GM4[f]	3,509	3,962	3,795	3,926	5,346	5,546	1,919	2,020, 3,795[g]	1,233
GM3	3,432	3,993	3,769	3,876	5,343	5,533	1,931	2,024	1,234
GM2	3,421	3,987	3,774	3,875	5,346	5,534	1,932	2,023	1,235
GM1	3,432	3,988	3,765	3,873	5,345	5,533	1,928	2,022	1,235

a, eroare ±0,001 ppm; b, include R-9, R-11, R-12 şi R-13; c, cele două şiruri de valori reprezintă acelaşi compus dar valorile de jos sunt pentru ceramid conţinând AG hidroxilati; d, agliconul este dihidroceramid; e, coincide cu valoarea HOD; f, erau deasemenea prezente rezonanţe la 5,320 şi 1,977 ppm, atribuite, respectiv, grupării metinice cis-olefinice şi grupării metilen adiacente din AG nesaturat; g, valoarea AG α-hidroxilat.

Tabelul 27. Deplasările chimice[a] ale protonilor metilenici şi metinici din resturile de NeuAc a unor gangliozide şi a NeuAc liber.

Compus	Deplasările chimice ale protonilor (ppm)								
H-3(e)	H-3(a)	H-4	H-5	H-6	H-7	H-8	H-9a	H-9b	
NeuAc[b]	2,494	1,505	3,608	3,468	3,600	3,221	3,421	3,368	3,600
GM4	2,658	1,536	3,571	3,450	3,564	3,180	3,39	3,311	3,564
GM3	2,749	1,364	3,551	3,463	3,569	3,199	3,40	3,377	3,569
GM2	2,558	1,621	3,700	3,39	3,148	3,161	3,485	3,340	3,613
GM1	2,281	1,636	3,744	3,37	3,116	3,184	3,495	3,335	3,619

a, eroare ±0,001 ppm; b,datele au fost obţinute pe un amestec de α- şi ß-anomeri ai NeuAc.

v. Tabelul 26), au fost atribuite, respectiv, la R-10, R-6 şi R-8, datorită similitudinii lor cu deplasările chimice, multiplicităţii şi intensităţilor rezonanţelor ceramidice analoage din GlcCer şi GalCer. In spectrul upfield al lui GM4, apare o rezonanţă alilică suplimentară la 1,98 ppm. Această rezonanţă a fost atribuită protonilor metilenici adiacenţi legăturii duble cis, care se găseşte relativ frecvent în GM4 datorită conţinutului ridicat în AG nesaturaţi. Hidroxilarea grupărilor acil gras din GM4 cauzează o deplasare downfield a semnalului grupării R-8. Rezonanţele grupării metilen H-3 axial şi ecuatorial [A-3(a) şi A-3(e)] ale resturilui de AS din gangliozide sunt observate în domeniul 1,4-1,6 ppm şi, respectiv, 2,3-2,8 ppm. Aceste semnale au fost atribuite (v. Tabelul 27) prin comparaţie cu deplasările chimice şi constantele de cuplare ale α-NeuAc liber şi prin absenţa acestor rezonanţe din spectrele asialo-derivaţilor.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Regiunea anomeră. Structurile discutate conţin, după cum s-a văzut mai sus, 1-4 resturi neutre aldo-hexopiranozil şi un rest de AS (gangliozidele). Un dublet H-1 (anomer), cu rezoluţie foarte bună, apare între 4 şi 5 ppm pentru fiecare rest oligozaharidic din GSL. Deplasările chimice pentru protonii anomeri sunt prezentate în Tabelul 28. Trebuie notat că resturile de AS sunt ketozil, prin urmare nu au protoni anomeri. Toate rezonanţele anomere au constante de cuplare mari (7-9 Hz), ceea ce este în acord cu configuraţia ß-D şi conformaţia $^4C_1$ din resturile oligozaharidice din GSL din seria ganglio. Cu excepţia Gal din GM4, care prezintă o rezonanţă unică în regiunea anomeră, se pot face atribuiri H-1 specifice numai în virtutea unor ipoteze asupra deplasărilor chimice ale protonilor anomeri. Dacă se presupune că H-1 din resturile de N-acetil-ß-hexozamina rezonează downfield de la 4,35 ppm, atunci dubletul de la 4,5 ppm din spectrul lui GA2 şi GA1 şi de la 4,8 ppm din spectrele GM2 şi GM1 pot fi atribuite lui H-1 din GalNAc. Această ipoteză se bazează pe studii asupra GSL din seriile globo- şi lacto. Se presupune că H-1 din resturile Glc rezonează cu regularitate upfield şi la o deplasare chimică similară celei din GlcCer; în acest caz dubletul de la 4,16 din spectrele di-, tri- şi tetrahexozil ceramidelor pot fi atribuite lui H-1 din Glc. Rezonanţele dintre 4,19 şi 4,28 ppm din spectrele LacCer, GA2, GM3 şi GM2 pot fi atribuite, datorită unicităţii lor, lui H-1 din Gal. Cu toate acestea, în spectrele GA1 şi GM1, apar doi dubleţi în aceeaşi regiune (4,19-4,28 ppm). Atribuirea lipsită de echivoc a acestor semnale, fie la H-1-Gal-II, fie la H-1-Gal-IV, necesită determinarea constantelor de cuplare J, iar aceasta se realizează prin tehnica 2-D-SECSY.

Regiunea olefinică. După cum rezultă din spectrele RMN protonică, fiecare spectru al gangliozidelor GM3, GM2 şi GM1 prezintă o pereche de rezonanţe cuplate reciproc (15,7 Hz) la 5,3 şi 5,5 ppm. Acestea sunt dubleţi de dubleţi şi, respectiv, dubleţi de tripleţi, după cum este de aşteptat pentru cei doi protoni metinici ai legăturii duble trans având ca grupări vecine protoni metinici şi, respectiv, metilenici. Deoarece aceste grupări funcţionale se găsesc numai în restul ceramidic, aceste două rezonanţe au fost atribuite la R-4 şi R-5. Pe baza deplasărilor chimice şi multiplicităţilor, rezonanţa de la 5,3 ppm este atribuită lui R-4 iar rezonanţa de la 5,5 ppm lui R-5 (Tabelul 26). Aceste atribuiri se bazează pe rezultatele studiilor pe GlcCer şi GalCer care conţin ceramid (J. Dabrowski şi colab., 1980). După cum este de aşteptat, rezonanţele olefinice nu apar în spectrul LacCer al cărui aglicon este dihidroceramid. Se observă, foarte puţin în sensul upfied faţă de R-4, rezonanţa protonilor metinici olefinici atribuiţi legăturii duble cis a AG din ceramid. In acord cu rezultatele anterioare RMN C-13, această rezonanţă cis este foarte intensă pentru GM4, în comparaţie cu rezonanţele cis ale altor GSL.

Tot aşa de importante ca datele upfield, anomere şi olefinice sunt datele constituţionale şi configuraţionale care sunt mascate în mai multe domenii suprapuse din regiunea 3-4 ppm. In cadrul acestor domenii sunt toţi protonii metilenici şi metinici ai miezului oligozaharidic, alţii decât H-1 precum şi protonii inelului NeuAc şi cei patru protoni ceramidici apropiaţi. Pentru a rezolva rezonanţele suprapuse ale acestor protoni, s-au realizat experimente de decuplare de spin monodimensionale (1-D) pe gangliozidul GM1, inclusiv spectroscopia prin diferenţă cu decuplare de spin (SDDS) prin metoda lui Dabrowski (1980). S-a găsit că cinci experimente SDDS, sau chiar mai multe, erau suplinite de către un singur experiment 2-D-SECSY, ultimul fiind mult mai rapid şi mai informativ, în sensul ca se obţineau, alături de deplasările chimice şi constantele de cuplare.

Studiile 2-D-SECSY. Domeniile de suprapunere a rezonanţelor din porţiunea 3-4 ppm a GSL conţinând 2-5 resturi glucidice (v. Tabelul 28), au fost descifrate prin considerarea datelor de integrare şi stabilirea constantelor de cuplare (J) a rezonanţelor componente ale fiecărui domeniu de suprapunere. Spre exemplificare s-a trasat concomitent spectrul 2-D-SECSY şi spectrul 1-D a gangliozidului GM2 în porţiunea 3-4 ppm şi regiunile anomere. In cuprinsul analizei, fiecare

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

subspectru a fost marcat cu literele i, ii, iii; au fost observate astfel trei arii ale densităților de contur deasupra axei centrale. Acestea reprezintă peak-urile de încrucișare dintre rezonanțele anomere și rezonanțele protonilor de pe atomii de carbon vecini. Fiecare rezonanță anomeră este atribuită subspectrelor i-iii conform cu deplasările chimice crescătoare. Fiecare proton anomer (i-1, ii-1, iii-1) se cuplează, respectiv, cu un singur alt proton (i-2, ii-2, iii-2). Continuând pe calea determinării valorilor J, se găsește că fiecare rezonanță H-2 se cuplează cu o singură altă rezonanță (i-3, ii-3, și, respectiv, iii-3). Similar, fiecare H-3 conduce la H-4, H-4 la H-5 iar în final H-5 la H-6a și H-6b. Se obțin astfel toate constantele de cuplare H-1 → H-6b pentru fiecare dintre cele trei spectre cu originea în regiunea anomeră.

Corelări subspectrale. Cu ajutorul subspectrelor, atribuirea semnalelor se realizează luând în considerare trei caracteristici ale fiecărui subspectru. Aceste caracteristici sunt următoarele, în ordinea utilității diagnostice: (1) numărul de protoni și modelul sau rețeaua lor; (2) succesiunea constantelor de cuplare vicinale între protonii componenți; (3) deplasările chimice ale protonilor componenți.

Subspectrele datorate glucidelor neutre. Modelul subspectrelor indică că cele trei resturi sunt aldo-hexoze, alte glucide având alte modele subspectrale.

Constituția fiecărui rest se stabilește în continuare luând în considerare rezonanțele H-1 și H-2. Astfel constatarea că rezonanțele H-1 sunt de intensitate egală precum și absența oricărui semnal H-1 minor, arată că toate resturile oligozaharidice sunt implicate în legături glicozidice și că nu este posibilă mutarotația. Constatarea că deplasarea chimică a lui H-2 din iii este mai mare de 3,5 ppm dar a lui i și ii este mai mică de 3,3 ppm indică că iii este o hexozamină N-acilată iar i și ii sunt hexoze. Rezultatul că rezonanța H-1 a lui i, ii și iii au constante de cuplare mari și o deplasare chimică mai mică de 4,3 ppm pentru i și ii și mai mică de 4,6 ppm pentru iii arată că toate cele trei resturi glucidice prezintă legături ß-piranozice. Se precizează că legăturile ß-furanozice ar fi 0,4 ppm downfield pentru hexoze sau N-acilhexozamine. Singletul a trei protoni de la 1,777 ppm arată că iii este N-acetilat.

Configurația fiecărui rest i-iii se stabilește luând în considerare mărimea și secvența constantelor de cuplare a fiecărui proton din inel. Această analiză configurațională este posibilă deoarece inelele aldopiranozice, care sunt prezente în mod tipic în gangliozide, se găsesc în conformația rigidă scaun iar relațiile Karplus între protonii acestor inele au fost studiate temeinic. Astfel seria constantelor de cuplare $J_{1,2}$, $J_{2,3}$, $J_{3,4}$, $J_{4,5}$, pentru configurația ß-galacto este L, L, S, S, (unde L reprezintă o constantă de cuplare mare (> 6Hz) iar S reprezintă o constantă de cuplare mică (< 4Hz). Pentru configurațiile α-galacto, ß-gluco și α-gluco corespund următoarele serii: S, L, S, S; L, L, L, L; și, respectiv S, L, L, L. Rezultatele experimentale arată că paleta constantelor de cuplare pentru i este L, L, L, L iar pentru ii și iii este L, L, S, S. Prin urmare restul i are configurația ß-gluco iar resturile ii și iii au configurația ß-galacto. Combinarea rezultatelor constituționale și configurationale duce la concluzia că i, ii și iii din GM2 sunt, respectiv, ß-glucopiranozil (I), ß-galactopiranozil (II) și 2-acetamido-2-deoxi-ß-galactopiranozil (III).

Subspectrul ceramidului. Caracteristicile a opt spini, a două capete terminale (care se cuplează la rezonanțele alkil metilenice) și includerea rezonanțelor olefinice trans (R-4 și R-5) indică cu claritate subspectrul porțiunii ceramidice. Numărul de protoni și modelul acestui subspectru servește pentru a stabili în mod independent structura sa deoarece alți agliconi posibili manifestă subspectre diferite. De ex, dihidroceramidul sau un steroid ar prezenta modele de șase spini și, respectiv, modele complexe. Apariția unui triplet intens la 2,02 ppm (R-8) dar nu la 3,80 ppm arată absența grupărilor acil gras α-hidroxilat. Apariția rezonanțelor foarte slabe la 5,32 și 1,98 ppm arată că AG nesaturați (legături duble cis) sunt prezenți cel mult în urme.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Subspectrul AS. Caracteristicile a nouă spini, a două zone terminale, succesiunea constantelor de cuplare şi includerea protonilor H-3 metilenici a AS pur arată că avem de-a face cu subspectrul restului de AS din gangliozidul GM2. Deplasările chimice ale unor porţiuni din subspectru arată că restul de AS nu este O-acilat pe A-4, -7, -8 şi -9; acilarea ar avea drept consecinţă o deplasare downfield de 1,6 ppm pentru aceşti protoni. Deplasarea chimică de 3,4 ppm şi singletul a trei protoni la 1,875 ppm arată că AS este N-acetilat şi nu N-glicoloilat; cea de-a doua alternativă ar duce la obţinerea paletei AB de doi protoni centrată la 3,88 ppm. Prin urmare restul de AS din gangliozidul GM2 este NANA.

Gal II şi Gal-IV. O problemă aparte o constituie, în cadrul corelaţiei dintre atomi şi semnale, stabilirea unei deosebiri între Gal-II şi Gal-IV, pentru structuri ca GA1, GM1, etc. Cele două resturi glucidice se deosebesc prin deplasările chimice ale protonilor H-3 şi H-4 a celor două resturi, deoarece II-3 şi -4 dar nu IV-3 şi -4, sunt implicate în legături glicozidice şi sunt deplasate downfield faţă de restul neglicozilat.

Următoarele regularităţi sunt remarcabile: subspectrul ceramidic la GSL neutre şi la gangliozide, în privinţa regiunii olefinice (R-4 şi R-5) şi în regiunea 3-4 ppm (R-1b, -2 şi -3). Notabilă este şi regularitatea privind restul Glc-I.

Tabelul 28. Deplasările chimice[a] ale protonilor metilenici şi metinici din resturile miezului oligozaharidic al unor GSL

Compus	Rest	Deplasările chimice ale protonilor (ppm)						
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6a	H-6b	
GlcCer	I	4,094	2,981	3,155	3,1	3,1	3,440	3,663
GalCer[c]	II	4,053	3.321	3,285	3,653	3,336	3,491	3,546
		4,093	3,309	3,288	3,651	3,344	3,500	3,546
LacCer	I	4,173	3,030	3,30	3,30	3,30	3,584	3,741
	II	4,199	3,40	3,30	3,613	3,40	3,528	3,584
GA2	I	4,161	3,036	3,335	3,288	3,293	3,598	3,745
	II	4,222	3,245	3,519	3,789	3,500	3,478	3,604
	III	4.462	3,614	3,519	3,614	3,335	3,40	3,478
GA1	I	4,159	3,033	3,325	3,289	3,296	3,612	3,741
	II	4,209	3,228	3,495	3,792	3,495	3,480	3,612
	III	4,566	3,768	3,647	3,792	3,341	3,435	3,498
	IV	4,216	3,325	3,245	3,604	3,341	3,388	3,512
GM4	II	4,063	3,269	3,919	3,684	3,213	3,468	3,530
GM3	I	4,156	3,037	3,328	3,292	3,297	3,606	3,741
	II	4,188	3.312	3,960	3,696	3,336	3,484	3,599
GM2	I	4,150	3,035	3,325	3,277	3,289	3,613	3,744
	II	4,274	3,158	3,744	3,920	3,470	3,463	3,613
	III	4,794	3,753	3,39	3,524	3,642	3,39	3,463
GM1	I	4,150	3,034	3,335	3,276	3,288	3,627	3,735
	II	4,275	3,131	3,732	3,935	3,486	3,471	3,627
	III	4,859	3,912	3,471	3,716	3,630	3,37	3,471
	IV	4,212	3,37	3,310	3,608	3,37	3,411	3,538

Spectrele bazate pe efectul Overhauser homonuclear bidimensional de nucleu protonic (2-D-NOE) au fost trasate pentru asialo-GM2 (GA2), gangliozidul GM2 şi gangliozidul GM1 la 500 MHz. Protonii anomeri ai fiecărui rest oligozaharidic au fost observaţi la cuplul NOE prin interacţiile 1,3- şi 1,5- diaxiale din cuprinsul resturilor glucidice (T. A. W. Koerner şi colab., 1983). O serie de GSL neutre din seria globo-, lactoneo- şi lacto- au fost studiate prin spectroscopia RMN în variantele: spectroscopie diferenţială prin decuplare de spin (SDDS) şi

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

efectul nuclear Overhauser (NOE) (J. Dabrowski şi colab., 1982). Studiile privind keratan sulfaţii au dobândit o semnificaţie deosebită deoarece liganzii care recunosc aceste structuri ar putea fi markeri timpurii pentru osteoartrită. Un astfel de fragment, un heptazaharid conţinând fucoză, rezultat prin acţiunea keratanazei asupra keratan sulfatului din cartilaj articular bovin, a fost studiat prin spectroscopie RMN ^{1}H (600 MHz) în varianta 2D COSY-45 (G.-H. Tai şi colab., 1994); pentru H-1 al Fuc legată α1-3 la GlcNAc s-a găsit o deplasare chimică de 5,121 ppm. Dispersia moleculară a heparinei în domeniul 3000-7000 a fost studiată prin spectroscopia RMN ^{13}C, prin determinarea raportului dintre semnalul atomilor anomeri şi semnalul atomilor interni (U. R. Desai şi R. J. Linhardt, 1994). Structura complexă a unor GSL din organisme marine a fost elucidată cu ajutorul spectroscopiei RMN ^{13}C: gangliozide din *Acanthaster planci* (Y. Kawano şi colab., 1990), acantacerebrozidul B, un ceramid monohexozid din *Asterina pectinifera* (R. Higuchi şi colab., 1990), gangliozide din *Asterias amurensis versicolor* (R. Higuchi şi colab., 1993), triterpenoid glicozid sulfaţi din *Cucumaria echinata* (T. Miyamoto şi colab., 1990). Din eritrocite de cabaline a fost izolată o nouă varietate moleculară a gangliozidului GM3: conţinând 9-O-acetil NGNA sau 6'-O-acetil galactoză; ambele structuri au fost caracterizate prin RMN mono- şi bidimensionale (Y. Yachida şi colab., 1996). Tratând gangliozidul GD1a cu diciclohexilcarbodiimidă a rezultat GD1a-dilactona; spectroscopia RMN ^{1}H a demonstrat că cele două inele lactonice au rezultat prin formarea a două legături ester între grupările hidroxil din poziţia doi a fiecărui rest de galactoză (G. Fronza şi colab., 1988). Prezenţa grupării O-Ac în poziţia 7 şi/sau 9 a AS din gangliozidul GD3 din lapte a fost confirmată prin spectroscopia homonucleară Hartman-Hahn bidimensională (S. Ren şi colab., 1992). Conformaţia şi configuraţia unor GSL, izolate din plasma sanguină de suine, au fost studiate prin RMN. GaLCer I^{3}-sulfatul a dat următoarele semnale: un semnal triplet la 4,02 ppm datorat unui proton de la C-3 al BCL, un triplet dublu la 5,39 ppm şi un dublet dublu la 5,57 ppm datoraţi, respectiv, protonilor legăturii duble trans de la C-4 şi C-5; trei dubleţi la 4,18, 4,19 şi 4,20 ppm, datoraţi protonului anomer al ß-Glc, precum şi semnale la 3,97 ppm datorate atomilor H-3 şi H-4 ai Gal au fost atribuiţi prin tehnica decuplării de spin. In cazul LacCer II^{3}-sulfatului s-a găsit un efect downfield datorat grupării sulfat. H-1 al α-Fuc din Fuc-GM1 este la 5,10 ppm (G. Hanagata şi colab., 1990). GM3-Lactona (R. K. Yu şi colab., 1985), lactonele GD3 (S. Ando şi colab., 1989) precum şi o serie de GSL neutre şi acide (S. Gasa şi colab., 1983) au fost studiate prin metoda RMN protonică. Prezenţa C_{18} şi C_{20} fitosfingozinei şi a 2-hidroxi-AG în icre de *Mugil cephalus* (Y.-T. Li şi colab., 1984) şi a 9-O-Ac-NeuAc în 9-O-Ac-GD3 din melanoma (J. Thurin şi colab., 1985) au fost confirmate prin RMN. Aceeaşi metodă a permis studii conformaţionale pentru tetrazaharidul din seria Mollu în soluţie (U. Dabrowski şi colab., 1993).

Un succes remarcabil al spectroscopiei RMN a constat în elucidarea structurii lactonelor gangliozidelor (Tabelul 29).

Tabelul 29.Deplasările chimice care indică lactonizarea gangliozidului GD3. Diferenţe ale deplasărilor chimice ale protonilor din lactonele gangliozidului GD3 în comparaţie cu ale gangliozidului nativ.

Fragment	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-7	H-8	H-9
GD3 lactona I									
R	-0,05(a) -0,05(b)	-0,06	-0,05	-0,01	0	0	0		
I	-0,05	-0,03	0	+0,24	0	-0,04(a) 0(b)			
II	-0,14	+0,04	+0,04	-0,16	0	0			
A			-0,36(a)	+0,02	-0,13	+0,64	+0,07	+0,60	0,95(a)

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

			+0,11(e)						0,94(b)
C			+0,04(a)	+0,67	-0,04	-0,05	+0,02	-0,08	+0,08(a)
			-0,52(e)						-0,03(b)
GD3 lactona II									
R	-0,04(a)	-0,05	-0,08						
	-0,04(b)								
I	-0,05	-0,03	-0,02		-0,01	-0,05(a)			
						-0,05(b)			
II	+0,23	+1,30	+0,29	-0,09					
A			-0,48(a)	+0,30	-0,15	+0,09	-0.09	+0,51	+0.86(a)
			+0,03(e)						+0,85(b)
C			+0,11(a)	+0,68	-0,08	-0,05	+0,21	-0,11	+0,03(a)
			-0,44(e)						-0,03(b)

O-acetilarea gangliozidelor apare preferenţial pe acidul neuraminic situat în poziţie terminală: 45-O-acetil GM3 în eritrocite de cabaline (S. Hakomori şi T. Saito, 1969; S. Gasa şi colab., 1983), 9-O-Ac GT1b în creier de şoarece (R. Ghidoni şi colab., 1980), 9-O-Ac-GD1a în eritrocite de şobolan (D. C. Gowda şi colab., 1984), 9-O-AcGD3 din celule melanoma (D. A. Cheresh şi colab., 1984).

Poziţia grupării O-ac în molecula glicolipidului intact a fost determinată prin spectroscopie RMN şi SM-FAB. Gruparea acetoxi ataşată la un atom de carbon determină o deplasare downfield pentru atomul de hidrogen legat la acel atom de C. În felul acesta a fost determinată poziţia de legare a grupării acetil în următorii compuşi: 4-O-AcGM3 (S. Gasa şi colab., 1983), 9-O-AcGD3 (J. Thurin şi colab., 1985; S. Ren şi colab., 1992), 7-O-AcGD3 (s. Ren şi colab., 1992; S.Ren şi colab., 1993); în mod similar a fost determinată poziţia pe sulfat din sulfo-3'- galactozil ceramid (S.Gasa şi colab., 1985).

Caracteristicile unor GSL acide din ţesut testicular de cocoş sunt următoarele. Spectrul RMN al sulfatidului a relevat un semnal ß în regiunea anomeră la 4.15 ppm. Celelalte semnale protonice ale inelului au fost stabilite prin metoda COSY şi semnalul H-3 s-a găsit a fi deplasat downfield (3,94 ppm) în comparaţie cu protonul corespunzător (3,29 ppm) din GalßCer, indicând o grupare sulfat în poziţia 3. Spectrul gangliozidului GM4 este similar cu datele publicate anterior pentru GM4 conţinând NeuAc, după cum a rezultat din semnalul anomer Galß1 la 4,07 ppm şi H-3eq a NeuAcα3 la 2,77 ppm. In plus de aceasta, semnalul de la 3,93 ppm indică o proporţie semnificativă de NGNA. Gangliozidul GD3 prezintă două semnale ß-anomere la 4,17 ppm (Glcß1) şi 4,33 ppm (Galß4). H-3eq şi H-3ax de la NeuAcα8 au fost identificate la 2,84 ppm şi, respectiv, la 1,25 ppm. Semnalele corespunzătoare NeuAcα3 au fost dificil de localizat dar rezonanţa metil acetamido de la 1,87 ppm corespunde la cel puţin şase protoni, ceea ce indică două resturi de acid sialic (D. P. Iga şi colab., Glycoconjugate J., 15, 1111 (1998)).

Iată câteva caracteristici RMN ale unor GSL izolate din ţesut testicular de curcan (D. P. Iga şi Silvia Iga, 1993; Silvia Iga, Teză de doctorat, Bucuresti, 1997).

Gangliozidul GM4. Gangliozidul GM4 (Fig 12) din testicul de curcan prezintă următoarele semnale:

- 7,45-7,52 ppm datorat protonilor amidici ai ceramidului;
- 8,02-8,2 ppm datorat protonilor N-acetil ai acidului sialic;
- 5,39- 5,57 ppm datorat protonilor legăturii duble ai C-4 şi C-5 din BCL;
- 4,24-4,30 ppm datorat protonilor anomeri ai galactozei.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

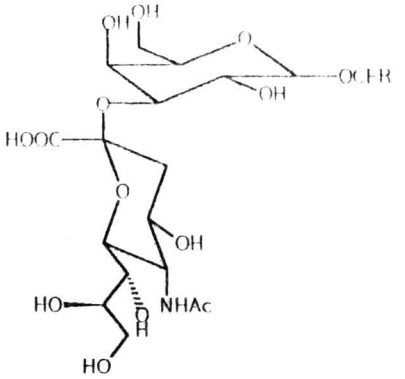


Fig. 12. Gangliozidul GM4 din testicul de curcan.

Gangliozidul GM3. Gangliozidul GM3 din testicul de curcan (Fig. 13) prezintă următoarele semnale:
- 8,02-8,2 ppm datorat protonilor N-acetil ai acidului sialic;
- 7,45-7,52 ppm datorat protonilor amidici ai ceramidului;
- 5,39-5,57 ppm datorat protonilor legăturii duble ai C-4 şi C-5 din BCL;
- 4,24-4,30 ppm datorat protonilor legăturii anomere a Gal;
- 4,17-4,18 ppm datorat protonului anomer al Glc legată direct la ceramid.

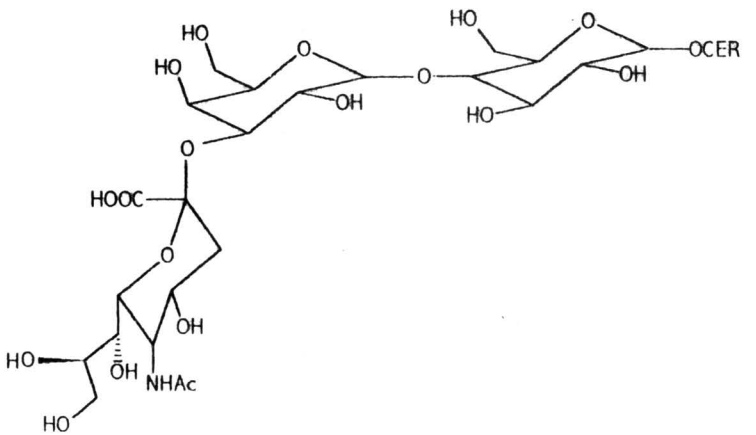


Fig. 13. Gangliozidul GM3 din testicul de curcan.

Gangliozidul GD3. Gangliozidul GD3 din acelaşi ţesut (Fig 14) prezintă următoarele semnale:
- 1,8 ppm datorat protonilor metilici ai grupării N-acetil din AS;
- 4,18 ppm datorat H-1 al ß-Glc;
- 4,29 ppm datorat H-1 al ß-Gal;
- 5,32 ppm datorat protonilor legaturii duble cis a AG;
- 5,38 si 5,37 ppm datorate protonilor legăturii duble trans ai C-4 şi respectiv C-5 din BCL;
- 7,45-752 ppm datorat protonului amidic al ceramidului.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

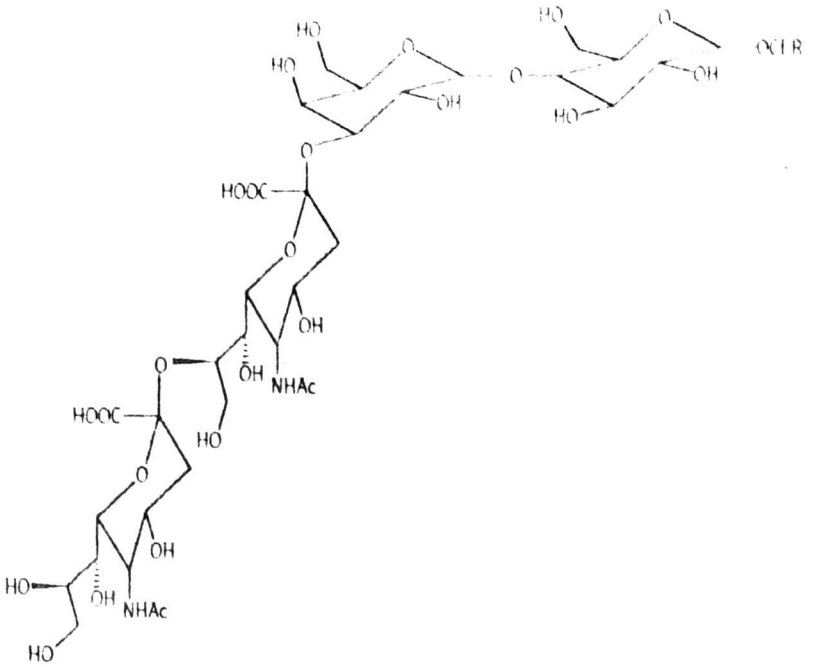


Fig. 14. Gangliozidul GD3 din țesut testicular de curcan.

Gangliozidul GT3. Gangliozidul GT3 din țesut testicular de curcan (Fig. 15) prezintă următoarele semnale:
- 1,80 și 1,89 ppm datorate protonilor grupării N-Ac ai AS;
- 4,18 ppm datorat protonului anomer al Glc;
- 4,26 și 4,30 ppm datorate protonilor anomeri ai Gal;
- 5,32 ppm datorat protonilor legaturii duble cis ai AG;
- 5,38 și 5,57 ppm datorate protonilor legăturii duble trans ai C-4 și C-5 din BCL;
- 7,45-7,52 ppm datorat protonului amidic al Cer.

Sulfatidul. Sulfatidul (sulfo-3GalCer) din același țesut (Fig. 16) prezintă următoarele semnale:
- 5,32 ppm, protonii legăturii duble cis a AG;
- 5,38 ppm si 5,57 ppm, protonii legăturii duble trans de la C-4 și respectiv C-5 a BCL;
- semnal triplet la 4,02, protonul C-3 al BCL;
- 4,20 ppm, protonul anomer al ß-Gal pe care este grefată în poziția 3 o grupare ester sulfat;
- 3,97 ppm, H-3 și H-4 a Gal.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

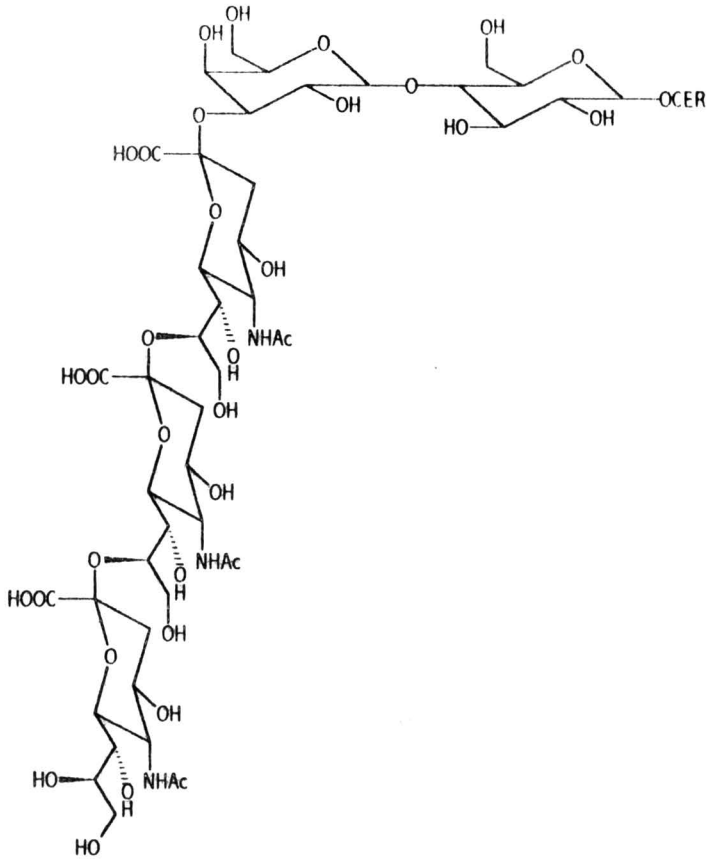


Fig. 15.Gangliozidul GT3 din testicul de curcan.

2.5. SULFATO-GLICOSFINGOLIPIDE

Sulfato-glicosfingolipidele cuprind glicosfingolipide sulfatate in porţiunea glucidică a moleculei. Cu toate că se cunosc glicoglicerolipide sulfonate, legătura chimică C-S nu a fost găsită până acum in cazul glicosfingolipidelor.

2.5.1.Cerebrozid 3-sulfatul

Acest compus (GalCer I^3-sulfat; sulfatid; sulfato-galactozil-ceramid; cerebrozid sulfat) a fost izolat din creier uman de către Thudichum (1884), care l-a numit sulfatid. Blix (1933) a obţinut acelaşi compus din creier şi a prezentat dovezi că conţine 4-sfingenină, acid gras legat ca amidă şi galactoză esterificată cu acid sulfuric. S-a presupus iniţial că poziţia grupării sulfat este la hidroxilul 6 al restului de galactoză dar ulterior Yamakawa şi colab., (1962), precum şi alţi autori (Stoffyn şi Stoffyn 1963), au stabilit că esterificarea sulfatului este la hidroxilul din poziţia 3 a galactozei, pe baza studiilor de permetilare şi rezistenţă unităţii galactozei la oxidare cu periodat. Pentru aceasta Taketomi şi Yamakawa (1964) au sintetizat GalCer 6-sulfat, prin reacţia dintre GalCer din creier bovin şi acid clorsulfonic. S-a obţinut un compus cu p. t. 165-170 °C, $(\alpha)_D$ = -0,4° (2,4% în piridină). Spectrul IR al celor doi esteri sulfat, natural şi sintetic, era

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

aproape identic. La oxidarea cu periodat, însă, rezultatele erau complet diferite, după cum rezultă din Tabelul 30. Experimentele de permetilare au dat rezultatul următor: metil-glicozidul permetilat obținut din GalCer sulfat natural s-a dovedit a fi metil-2,4,6-trimetil-galactozid în timp ce din GalCer sulfat sintetic s-a obținut metil-2,3,4-trimetilgalactozid. Aceste rezultate au demonstrat că sulfato-monohexozil-ceramidul natural este GalCer 3-sulfat. Galactoza are configurația ß, după cum arată spectroscopia în IR (A. Rosenberg și E. Chargaff, 1958) și hidroliza enzimatică cu ß-galactozidază (N. Holliday și colab., 1940).

Tabelul 30.Oxidarea comparativă cu periodat a GalCer și GalCer sulfat.

Compus	Galactoza %	
	Netratat	Tratat
GalCer	20,5	0
GalCer sulfat natural	18,5	18,0
GalCer sulfat sintetic	18,3	0

GalCer I^3-sulfatul se acumulează anormal în sistemul nervos central și rinichi la pacienții cu leucodistrofie metacromatică, o boală concretizată în demielinizare difuză (H. Jatzkewitz, 1960). Rinichii conțin în mod normal concentrații neobișnuit de înalte din acest glicosfingolipid (E. Martensson, 1966) și s-a observat că lipidele rinichiului conțin o proporție ridicată de 4-D-hidroxisfingenină în timp ce creierul nu conține acest compus. GalCer I^3-sulfatul este deasemenea prezent în carcinomul gastric uman și în intestinul subțire de câine (J. M. McKibbin, 1969), intestin de porc și mucoasa gastrică (B. L. Slomiany și colab., 1974) împreună cu alte sulfatoglico-sfingolipide. Structura GalCer I^3-sulfatului este prezentată în Fig. 16.

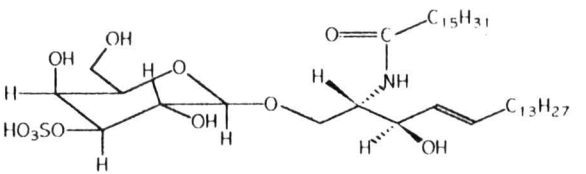


Fig. 16.Cerebrozid 3-sulfat conținând acid palmitic în ceramid.

2.5.2. Lactozilceramid sulfatul

Acest compus (LacCer II^3-sulfat) a fost izolat mai întâi din rinichi uman (E. Martensson, 1966) unde reprezintă cam 30% din fracția totală sulfato-glicosfingolipid. S-a relatat deasemenea a fi un constituent al fracției glicosfingolipid din intestinul subțire de câine (J. M. McKibbin, 1969) și mucoasa gastrică porcină (B. L. Slomiany și colab., 1974). În cele mai multe cazuri compoziția în carbohidrați este un raport echimolecular de glucoză și galactoză iar hidroliza acidă menajată dă glucozilceramid. Martensson (citat de B. L. Slomiany și colab., 1974) a observat câteva procente de GalCer în fracția monoglicozil-ceramid după hidroliza parțială a sulfo-GSL din rinichi uman, indicând deci că ar putea exista un sulfato-galabiozil-ceramid.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

La oxidarea cu periodat a LacCer II^3-sulfat, galactoza este neafectată, în timp ce în compusul desulfatat Gal era oxidată.

Experimente de permetilare au arătat că LacCer II^3-sulfat duce la 2, 4, 6, -trimetil-galactoza şi 2, 3, 6-trimetilglucoză. După desulfatarea LacCer sulfatului rezultă, prin permetilare, 2, 3, 4, 6-tetrametilgalactoză şi 2, 3,6-trimetilglucoză; în această etapă nu se mai obţine deloc 2, 4, 6-trimetil galactoză. Prin urmare gruparea sulfat este legată la gruparea hidroxil din poziţia 3 a Gal iar legătura dintre Gal şi Glc este Gal1-4Glc.

Configuraţia ß a legăturii dintre lactoză şi ceramid precum şi dintre Gal şi Glc a fost confirmată pentru LacCer II^3-sulfat din plasma sanguină de la suine prin spectroscopie RMN (G. Hanagata şi colab., 1990). Astfel au fost obţinute următoarele semnale (în hexadeuterodimetil sulfoxid/H_2O, 50:1, în volume; temperatura de lucru 90 °C; frecvenţa 500 MHz; etalon de comparaţie tetrametilsilan): doi dubleţi la 4,19 şi 4,33 ppm (datoraţi, respectiv, protonilor anomeri ai ß-Glc şi ß-Gal; un dublet dublu la 4,04 ppm (atribuit H-3 a Gal deplasat *downfield* datorită legăturii ester sulfat) şi un dublet la 3,95 ppm (datorat H-4 a Gal). Un spectru RMN-^1H similar a fost obţinut pentru LacCer sulfat din celule renale de carcinoma umană (N. Sakakibara şi colab., 1989). Prin tratarea LacCer sulfat din plasmă sanguină de suine cu arilsulfataza A din placentă umană, în prezenţă de taurodeoxicolat de sodiu, a rezultat LacCer. Prin urmare structura LacCer II^3-sulfat este următoarea: HSO_3-3Galß1-4Glcß1-1'Cer (Fig. 17).

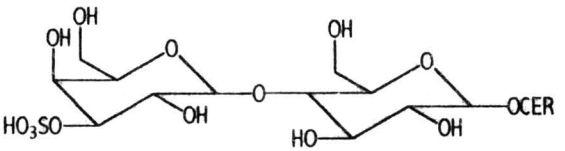


Fig. 17.LacCer II^3-sulfat cu fragment ceramidic eterogen.

2.5.3. Trihexozilceramide sulfatate

A. În mucoasa gastrică de la suine a fost găsit, alături de GalCer I^3 sulfat şi LacCer II^3-sulfat, şi un trihexozilceramid sulfatat (B. L. Slomiany şi colab., 1974).

Toti trei compuşii prezintă absorbţie puternică la 1240 cm^{-1} datorată întinderii legăturii S=O. Prezenţa unui maxim de absorbţie la 832 cm^{-1} (datorită vibraţiei C-O-S) în toate trei sulfatidele arată că gruparea hidroxil secundară a unui glucid conţine o grupare ester sulfat.Trihexozilceramid sulfatul dă prin desulfatare galactozil-lactozil-ceramid.

Analiza glucidelor după tratarea cu periodat a trihexozilceramid sulfatului a arătat că jumătate din galactoză şi glucoză erau distruse, în comparaţie cu cantităţile din aceste glucide recuperate din esterul sulfat intact. Pe de altă parte, oxidarea cu periodat a ceramid trihexozidului rezultat după desulfatare, a dus la distrugerea completă a galactozei şi glucozei.

Prin hidroliza acidă parţială a trihexozilceramid sulfatului rezultă: GlcCer, Gal-Glc-Cer, Gal-Gal-Glc-Cer.

Experimente de permetilare, urmate de hidroliză, reducere şi acetoliză, a dus la următorii alditol acetaţi: 2,4,6-tri-O-metilgalactitol, 2,3,6-tri-O-metilgalactitol şi 2,3,6-tri-O-metilglucitol.

Toate aceste rezultate arată că structura trihexozilceramidului sulfatat din mucoasa gastrică de suine este următoarea: HSO_3-3Galß1-4Galß1-4Glcß1-1'Cer (Fig. 18). Interpretarea unor relaţii metabolice dintre cele trei sulfatide izolate din mucoasă gastrică de suine este posibilă cu ajutorul Tabelului 31.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

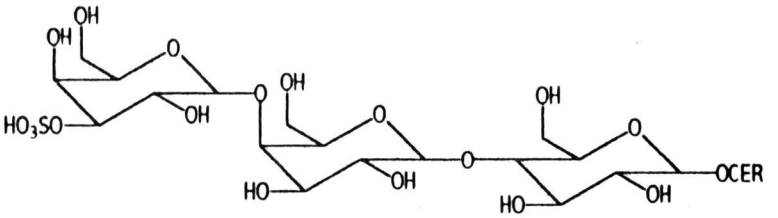


Fig. 18.Trihexozilceramid sulfatat din mucoasa gastrică de suine.

Tabelul 31.Compoziţia în acizi graşi şi baze cu catenă lungă a sulfatidelor din mucoasa gastrică de porc.

Formulă prescurtată	Monohexozosulfat		Dihexozosulfat		Trihexozosulfat	
	Acid gras (%)	BCL(%)	Acid gras (%)	BCL(%)	Acid gras (%)	BCL(%)
14:0	0,3		1,4		1,5	
16:0	9,9		16,9		18,7	
18:0	5,8	4,2	26,8	2,4	29,2	1,9
18:1	22,3	93,4	35,3	92,8	25,5	95,1
18:0α-OH	2,0					
20:0	1,4		2,7		3,2	
20:1	2.7		6,5		8,9	
20:0α-OH					1,0	
22:0	2,2					
22:1	0,8		2,1		3,0	
22:0α-OH					2,5	
24:0	5,9		1,1			
24:1	10,2		1,7		3,1	
24:0α-OH	35,2		0,4		0,3	
Neidentificat	1,3	2,4	5,1	4,8	3,1	3.0

B.Din rinichi de şobolan a fost izolat un trihexozilceramid sulfatat din seria ganglio, adică gangliotriaozil-ceramid sulfat (sulfoglicolipidul A) (K. Tadano şi Ishizuka, 1980; K. Tadano şi Ishizuka, 1982) (Fig. 19). Compusul a fost purificat prin cromatografie de schimb ionic pe DEAE-Sephadex A-25 urmată de cromatografie de adsorbţie pe silicagel. Spectrul IR al sulfoglicolipidului A este foarte asemănător cu al GalCer I^3-sulfat cu excepţia că raportul dintre absorbţia la 3600-3100 cm^{-1} (OH) şi absorbţia la 2920-2840 cm^{-1} (-CH_2-) este mult mai mare.

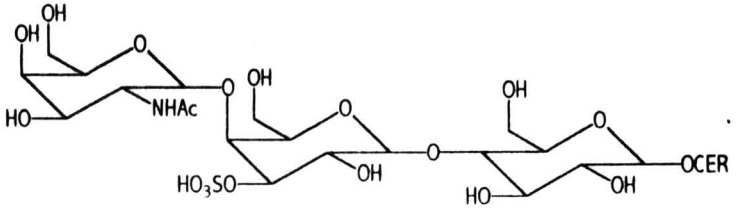


Fig. 19. Gangliotriaozil-ceramid sulfatat din rinichi de şobolan.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Absorbţiile la 1230 şi 815 cm^{-1} indică prezenţa unui ester sulfat ecuatorial al hexòzei. Absorbţia la 890 cm^{-1} indică prezenţa a cel puţin unei configuraţii ß a hexopiranozidului .

Cromatografia gaz-lichid a sulfoglicolipidului A a arătat că acesta conţine cantităţi echimolare de Gal, Glc, GalNAc. Acetaţii alditolilor parţial metilaţi obţinuţi din sulfoglicolipidul A conţin cantităţi aproximativ echimolare din următorii acetaţi: 2,3,6-tri-O-metilglucitol, 2,6-di-O-metilgalctitol şi 3,4,6-tri-O-metil-2-deoxi-2-N-metilaceta-midogalactitol. Aceste rezultate arată că esterul sulfat este ataşat la o grupare ecuatorială a galactozei (C-3) sau glucozei (C-4) şi că N-acetilgalactozamina este situată la capătul nereducător. Acelaşi tratament al glicolipidului desulfatat a arătat dispariţia 2,6-di-O-metil-1,3,4,5-tetra-O-acetilgalactitol şi apariţia 2,3,6-tri-O-metil-1,4,5-tri-O-acetil-galactitol în produşii obţinuţi prin permetilare-acetoliză. Acest rezultat arată că sulfatul este ataşat la gruparea hidroxil C-3 a galactozei.

Rezultatele de mai sus arată că structura sulfoglicolipidului A este GalNAc1-4(3sulfo-) Gal1-4Glc1-1Cer. Existenţa a două legături amidice în sulfoglicolipidul A a fost confirmată prin spectroscopia în IR: absorbţia la 1540 şi 1635 cm^{-1} este mai mică decât în cazul globozidului (două legături amidice) dar mai mare decât a globotriaozilceramidului (o legătură amidică) (K. Tadano şi I. Ishizuka, 1982). Oxidarea cu periodat-degradarea Smith a sulfolipidului A a dus la LacCer şi LacCer sulfat.

Spectrul RMP la 45 sau la 58 °C a indicat un dublet la 4,71 ppm (J=8,4 Hz). Semnalul respectiv a fost atribuit protonului anomer al 2-deoxi-2-acetamido-ß-galactopiranozidului, deoarece valoarea deplasării chimice era apropiată de a GalNAc din gangliotriaitol (4,61 ppm, J=7,5 Hz) sau din globotetraitol (4,64 ppm, J=8,0 Hz). Dubletul distinct de la 4,46 ppm (J=8,0 Hz), observat prin măsurători la 23,4 °C, era similar rezonanţei datorată ß-Gal implicată într-o legătură GalNAcß1-4 din oligozaharidul redus rezultat din gangliotriaozil-ceramid provenit din eritrocite de cobai (4,49 ppm, J=7,2 Hz), precum şi similar cu rezonanţa ß-Gal implicată într-o legătură cu Galα1-4 în cadrul oligozaharidului redus provenit din globotriaozil-ceramid din rinichi de şobolan (4,59 ppm, J=7,5 Hz) sau din rinichii unui pacient cu maladia Fabry (4,59 ppm, J=7,5 Hz). Efectul de deecranare al grupării ecuatoriale 3-sulfat asupra rezonanţei protonului anomer al Gal a fost de numai 0,06 ppm. Spectrul RMP a arătat prezenţa unui proton anomer al 2-deoxi-2-acetamido-ß-galactopiranozidului terminal precum şi prezenţa ß-Gal în structura GalNAcß1-4Galß- .

Cromatografia gaz-lichid a produşilor metanolizaţi, obţinuţi după oxidarea cu periodat a sulfoglicolipidului A nativ, a arătat degradarea completă a N-acetilgalactozaminei: a rezultat glicerol, derivând din GalNAc nesubstituită. Întrucât glucoza, care prezintă o legătură glicozidică în poziţia 4, nu este afectată de această oxidare rezultă că acest glucid este legat glicozidic la baza sfingoidă, tocmai ca în LacCer sulfat, gangliozidul GD3, Gb4Cer, II^3NeuAc-Gg4Cer. Toate unităţile glucidice ale sulfolipidului A sunt degradate prin oxidare cu trioxid cromic, în condiţii în care prin oxidarea Gb4Cer numai o moleculă de Gal rămâne intactă. Acest rezultat sugerează că glucoza şi N-acetilgalactozamina, care nu posedă ca substituent un ester sulfat acido-labil, conţin configuraţia ß-anomeră. Rezultatul de mai sus, corelat cu rezultatele dela RMP, arată că toate resturile glucidice din sulfoglicolipidul A prezintă legătura ß-glicozidică. Prin urmare structura sulfoglicolipiduui A este următoarea: GalNAcß1-4(HSO_3-3)Galß1-4Glcß1-1'Cer (Fig. 19).

2.5.4 .Gangliotriaozilceramid di-sulfatat

În rinichi de şobolan a fost găsit un sulfatoglicosfingolipid conţinând două grupări ester sulfat numit sulfoglicolipidul P (K. Tadano şi I. Ishizuka, 1981) (Fig. 20).
Spectrul IR al sulfo-glicolipidului P este similar celui al Gg3Cer sulfat cu excepţia unei absorbţii mai pronunţate la 1240 şi 820 cm^{-1} datorită grupării ester sulfat ecuatoriale. Absenţa absorbţiei la 850 cm^{-1} arată că legăturile ester se găsesc exclusiv în configuraţia ecuatorială, gruparea sulfat axială nefiind prezentă; în acest mod a fost exclusă ataşarea grupării ester sulfat

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

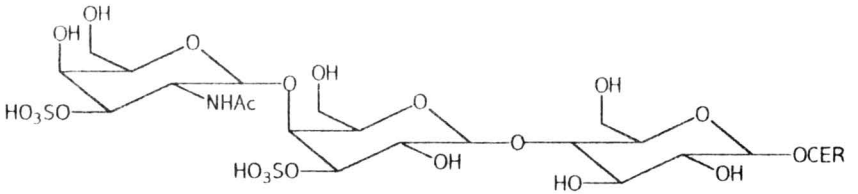


Fig. 20.Gangliotriaozilceramid di-sulfatat din rinichi de şobolan.

la hidroxilul C-4 al N-acetilgalactozaminei sau galactozei. Absorbţia la 890 cm^{-1} indică prezenţa a cel puţin unei configuraţii ß-anomere a hexopiranozidului.

Prin analiza glucidelor componente prin cromatografie gaz-lichid s-a arătat că sulfolipidul P conţine câte un mol din următoarele glucide: galactoza, glucoza şi N-acetil-galactozamina. Rezultatul analizei sulfatului a stabilit prezenţa a două grupări ester sulfat, în acord cu absorbţia mai pronunţată a grupării ester sulfat (1240 cm^{-1}) în spectrul IR.

Sulfoglicolipidul P, supus permetilării, acetolizei, reducerii şi acetilării , dădea acetaţii următorilor compuşi: 2,3,6-tri-O-metilglucitol, 2,6-di-O-metilgalactitol şi 4,6-di-O-metil-2-N-metilacetamido-2-deoxigalactitol în proporţii echimoleculare. Acest rezultat a fost confirmat prin sistemul gaz-cromatografie - spectrometrie de masă.

S-a arătat că galactoza, glucoza, precum şi N-acetilgalactozamina sunt rezistente la tratamentul cu periodat al sulfoglicolipidului P, in condiţii in care expunerea Gg3Cer sulfatului la acest reactiv duce la degradarea completă a N-acetilgalactozaminei. Acest rezultat sugerează că glucoza este legată la baza sfingoidă iar grupările hidroxil C-3 ale galactozei şi galactozaminei sunt ambele ocupate. Rezultatele oxidării cu periodat sunt in bun acord cu studiile de permetilare, sugerând că grupările ester sulfat sunt ataşate la grupările hidroxil C-3 ale resturilor de galactoză şi N-acetilgalactozamină.

Desulfatarea sulfoglicolipidului P ducea la Gg3Cer sulfat; în condiţii mai energice sulfoglicolipidul P era transformat complet în: Gg3Cer sulfat, Gg3Cer şi LacCer.

Conform rezultatelor de mai sus i s-a atribuit sulfoglicolipidului P structura următoare: HSO_3-3GalNAcß1-4(HSO_3-3)Galß1-4Glcß1-1'Cer

2.5.5.Gangliotetraozil ceramid di-sulfatat

Într-un extract lipidic din rinichi de şobolan a fost găsit un tetraglicozil-ceramid bis-sulfatat numit sulfoglicolipidul Q (Fig. 21). Analiza compoziţiei acestui compus a arătat că

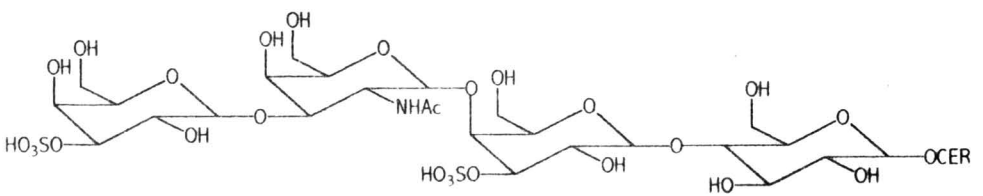


Fig. 21.Gangliotetraozil-ceramid di-sulfatat din rinichi de şobolan.

porţiunea glucidică este formată din doi moli galactoză, un mol glucoza şi un mol N-acetilgalactozamină. Analiza colorimetrică a indicat prezenţa a doi moli sulfat ca grupări ester.

Spectrul IR al sulfoglicolipidului Q este similar celui al bis-sulfo-Gg3Cer din aceeaşi sursă. Absorbţia la 1060 cm^{-1} , datorată legăturii C-OH, este mai pronunţată decât în bis-sulfo-

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Gg3Cer indicând că sulfoglicolipidul Q conține un fragment glucidic suplimentar în moleculă. Absorbția mai intensă la 1240 cm^{-1} (ester sulfat) în cazul sulfoglicolipidului Q decât în monosulfo-Gg3Cer era în bun acord cu rezultatele analizei chimice a sulfatului. Absorbția la 815 cm^{-1} și absența benzii 850 cm^{-1} demonstrează că sulfoglicolipidul Q conține grupări ester sulfat ecuatoriale. Absorbția la 890 cm^{-1} indică prezența a cel puțin unei configurații ß-anomere a hexopiranozidului.

Permetilarea sulfoglicolipidului Q nativ ducea, după acetoliză, reducere și acetilare, la acetații următorilor compuși: 2,3,6-tri-O-metil-glucitol, 2,6-di-O-metilgalactitol, 4,6-di-O-metil-2-N-metil-acetamidogalactitol și 2,4,6-tri-O-metilgalactitol, în proporții echimolare. Rezultatele permetilării, împreună cu spectroscopia IR au arătat că grupările ester sulfat ar putea fi atașate la doi hidroxili ecuatoriali localizați pe C-3 ai GalNAc, C-3 Gal sau C-4 Glc.

Expunerea sulfoglicolipidului Q la oxidarea cu periodat a arătat că toate componentele glucidice erau rezistente la oxidarea cu periodat. Rezistența glucozei substituite în poziția 4 a sugerat că glucoza este legată la baza sfingoidă. Prin urmare atașarea grupării ester sulfat la C-4 al glucozei a fost exclusă. Rezistența Gal și GalNAc la oxidarea cu periodat a sugerat că grupările hidroxil C-3 atât a Gal cât și a GalNAc sunt ocupate. Aceste rezultate ale oxidării cu periodat sunt în acord cu studiile de permetilare.

Deoarece atașarea posibilă a grupării ester sulfat la C-4 a Gal a fost exclusă de către rezultatul spectroscopiei IR (absența grupării ester sulfat axiale), s-a sugerat că grupările ester sulfat sunt atașate la hidroxilii C-3 ai GalNAc și/sau Gal.

Hidroliza acidă parțială a sulfoglicolipidului Q ducea la sulfoglicolipidul Q-I desulfatat (DSQ-I) și la LacCer. LacCer ca produs de hidroliză a sulfoglicolipidului Q a indicat că unul din cele două resturi Gal este atașat la Glc. DSQ-I conține Gal, Glc și GalNAc în raportul molar 2:1:1. DSQ-I permetilat dădea, după acetoliză, reducere și acetilare, acetații următorilor hexitoli: 2,3,6-tri-O-metilglucitol, 2,6-di-O-metilgalactitol, 4,6-di-O-metil-2-N-metilacetamidogalactitol și 2,3,4,6-tetra-O-metilgalactitol. Dispariția 2,4,6-tri-Ometilgalactitol acetatului și apariția 2,3,4,6-tetra-O-metilgalactitol acetatului ca produs de permetilare-acetoliză a lui DSQ-I arată că gruparea ester sulfat este atașată la C-3 al galactozei terminale. Oxidarea cu periodat a DSQ-I, în paralel cu gangliozidul GM1a, ducea la degradarea a un mol de Gal, în acord cu studiile de permetilare. Tot experimentele de permetilare au sugerat că cel de-al doilea ester sulfat se găsește la C-3 al Gal interne, și nu pe N-acetilgalactozamină ca în bis-sulfo-Gg3Cer (K. Tadano și colab., 1982).

Din rezultatele de mai sus a fost atribuită structura lui DSQ-I ca fiind Gal1-3GalNAc1-4(HSO_3-3)Gal1-4GlcCer și a sulfoglicolipidului Q ca fiind (HSO_3-3)Gal1-3GalNAc1-4(HSO_3-3)Gal1-4GlcCer.

Determinarea configurației anomere s-a realizat prin două metode: oxidarea cu trioxid de crom și spectroscopia RMN. Toate unitățile glucidice ale lui DSQ-I erau oxidate cu trioxid cromic; experimente în paralel utilizând Gb3Cer și Gb4Cer au arătat că un mol de Gal nu era degradată. Aceste rezultate sugerează că Glc, GalNAc și cele două resturi Gal conțin configurația ß-anomeră. Spectrul RMP al sulfoglicolipidului Q in cloroform-metanol este similar cu cel al monosulfo- și bis-sulfo-Gg3Cer, cu excepția unei perechi de semnale foarte intense care au fost atribuite protonilor anomeri ai ß-galactozei terminale și ai ß-galactozei din restul dizaharidic GalNAc1-4Galß1- . O altă pereche de semnale a fost atribuită protonului anomer al ß-N-acetilgalactozaminei din restul dizaharidic Gal1-3GalNAcß1-. Spectrul RMP în dimetil sulfoxid deuterat a confirmat configurația ß a Gal terminale, a N-acetil-galactozaminei și al celui de-al doilea rest de Gal.

Spectrul de masă al di-desulfo-glicolipidului Q trideuteriometilat a prezentat ioni intenși la m/z 222 și 187 (222 - C^2H_3OH), format prin expulzarea hexozei terminal monotrideuteriotrimetilate (m/z 219 + 3). Intensitatea ionului cu m/z 190 (222 - CH_3OH) era de aproximativ 30% din intensitatea celui cu m/z 187 (222 - C^2H_3OH), indicând că gruparea metil de

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

la C-3 a Gal este semnificativ mai labilă. Spectrul a prezentat un peak cu m/z 467 corespunzător restului terminal monotrideuteriometil-hexozil-O-hexozaminil-O-. Ionul cu m/z 674, datorat restului monotrideuteriometilhexozil-O-hexozaminil-O-monotrideuteriometil-hexozil-O-, a fost deasemenea observat. Existența ionului cu m/z 228 ca peak de bază constituie dovada pentru prezența hexozaminei neramificate mono-substituite și pentru substituția la C-3. Spectrul mai conține peak-uri la m/z 878 și 879 (m/z 878 + H$^+$), ceea ce a indicat că structura părții carbohidrat conține fragmentul monotrideuteriometilhexozil-O-hexozil legat la trihidroxisfinganină acilată. S-a mai constatat că unitatea dizaharid internă este legată la un ceramid conținând o serie de AGN: (24:0 la m/z 878 (m/z 879), 23:0 la m/z 864 (m/z 865), 22:0 la m/z 850 (m/z 851), și 20:0 la m/z 822 (m/z 823); 24:0 (m/z 835), 23:0 la m/z 820 (m/z 821) și 22:0 la m/z 806 (m/z 807). Ionii cu m/z 1301 și m/z 1345, proveniți de la tetrazaharidul ditrideuteriometilat legat la 4-hidroxisfinganina acilată, au fost deasemenea observați. Ionii fragment pentru hexozil-O- (m/z 222), hexozil-O-hexozaminil-O- (m/z 467) și hexozil-O-hexozaminil-O-hexozil-O- (m/z 674), reprezentând valori mai mari cu trei unități (m/z 219 + 3), tot cu trei unități (m/z 464 + 3) și cu șase unități (m/z 668 + 6) au indicat prezența hexozei monotrideuteriometilate atât în poziție terminală cât și intern. Spectrul de masă al di-desulfo-glicolipidului Q metilat a fost similar cu spectrul Gg4Cer metilat, cu excepția acestor schimbări de masă. S-a confirmat astfel încă odată secvența glucidică a sulfoglicolipidului Q și pozițiile celor două grupări sulfat.

S-a relatat că deplasările chimice ale protonilor GalNAc s-au strămutat downfield cu 0,21 ppm și cu 0,25 ppm, în gangliozidele GD1a și respectiv GM1a, datorită efectului AS atașat la gruparea hidroxil de la C-3 a Gal vecine. În mod contrar, efectul grupării ester sulfat de la C-3 a Gal asupra rezonanței protonului anomer a GalNAc din bis-sulfo-Gg4Cer este neglijabil, fiind similar celui din bis-sulfo-Gg3Cer.

Rezultatele de mai sus, împreună cu oxidarea cu trioxid cromic, au arătat că toate resturile glucidice din sulfoglicolipidul Q sunt legate ß-glicozidic. Din aceste date a fost propusă structura completă a sulfoglicolipidului Q: HSO_3-3Galß1-3GalNAcß1-4(HSO_3-3)Galß1-4Glcß1-1'Cer (Fig. 21).

2.5.6. Neolactotetraozilceramid sulfat

Din mucoasa gastrică de suine a fost izolat un glicosfingolipid sulfatat din seria neolacto, nLc4Cer sulfat (B. L. Slomiany și A. Slomiany, 1978) (Fig. 22). Spectrul IR al acestui glicolipid seamănă cu cel al glicosfingolipidelor neutre cu excepția prezenței suplimentare a unei absorbții puternice la 1240 cm^{-1} și un maxim la 820 cm^{-1}. Absorbția la 1240 cm^{-1} indică prezența grupării ester sulfat în timp ce maximul de la 820 cm^{-1} indică faptul că gruparea hidroxil primară a glucidului este sulfatată.

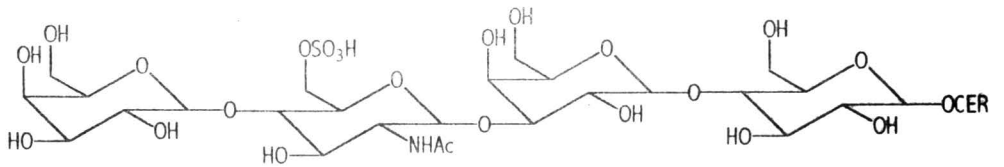


Fig. 22. Neolactotetraozil-ceramid sulfat din mucoasă gastrică de suine.

Glicolipidul nativ, dar nu produsul lui de desulfatare, reacționeaza ca sulfolipid in testul lui Kean (1968) și conține un mol sulfat/mol de glucoză. Solvoliza acidă (desulfatarea) glicolipidului izolat ducea la un compus neutru care migra cu viteză mai mare la CSS.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Cromatografia gaz-lichid a alditol acetatilor şi metil glicozizilor, formaţi din porţiunea carbohidrat a glicolipidului, a stabilit prezenţa galactozei, glucozei şi N-acetilgalactozaminei în raport molar 2:1:1. Aceste rezultate arată în mod clar că glicolipidul conţine o catenă tetrahexozil la care este ataşat un rest sulfat.

Aranjarea secvenţială a unităţilor glucidice şi configuraţia anomeră a legăturilor glicozidice din catena tetrazaharidică a glicolipidului studiat a fost elucidată cu ajutorul glicozidazelor specifice. Glicolipidul nativ precum şi glicolipidul desulfatat nu erau hidrolizate de către α-galactozidază şi ß-N-acetilhexozaminidază, dar ambii erau hidrolizaţi la ceramid trihexozid de către ß-galactozidază. Nici ß-N-acetilhexozaminidaza nici α-galactozidaza nici ß-galactozidaza nu hidrolizează mai departe ceramid trihexozidul derivat din glicolipid nativ. În schimb ceramid trihexozidul format din glicolipidul desulfatat era convertit cu uşurinţă la ceramid dihexozid (Gal-Glc-Cer) prin incubare cu ß-N-acetilhexozaminidază. Ceramid dihexozidul era degradat mai departe la glucozil ceramid de către ß-galactozidază. Rezultatele hidrolizei enzimatice de mai sus arată că glicolipidul de-sulfatat are structura: Galß-GlcNAcß-Galß-Glcß-Cer. Rezistenţa trihexozid ceramidului, derivat din glicolipidul nativ, la hidroliza mai avansată de către glicozidază sugerează că glicolipidul nativ conţine gruparea ester sulfat situată pe restul subterminal de GlcNAc al sulfo-GSL nativ.

Poziţia de legare a grupării ester sulfat la GlcNAc precum şi poziţiile legăturilor dintre glucide în glicolipidul studiat au fost stabilite prin oxidarea cu periodat şi analiza de metilare. Oxidarea cu periodat a glicolipidului nativ ducea la pierderea unui rest de Gal; aceeaşi reacţie ducea la pierderea unui rest GlcNAc din compusul obţinut prin hidroliza cu ß-galactozidază. Aceste rezultate sugerează că restul N-acetilglucozamină subterminal din glicolipidul nativ este substituit la C-3 sau C-4 cu galactoză şi la C-6 cu gruparea ester sulfat . Glicolipidul nativ permetilat dădea, după hidroliza, reducere şi acetilare următorii acetaţi: 2, 3, 4, 6, -tetra-O-metilgalactitol, 2, 4, 6-tri-O-metilgalactitol, 2, 3, 6-tri-O-metilglucitol şi 3-O-metil-N-metilacetamidoglucitol. Glicolipidul permetilat după desulfatare dădea urmă-torii alditol acetaţi: 2, 3, 4, 6-tetra-O-metilgalactitol, 2, 4, 6-tri-O-metilgalactitol, 2, 3, 6-tri--O-metilglucitol şi 3,6-di-O-metil-N-metilacetamidoglucitol. Aceste rezultate indică fără dubiu că N-acetilglucozamina din catena oligozaharidică a glicolipidului intact este substituita la C-4 cu galactoză şi la C-6 cu o grupare ester sulfat. Prin urmare structura nLc4Cer sulfatului din mucoasă gastrică de suine este următoarea: Galß1-4(HSO_3-6)GlcNAcß1-3Galß1-4Glc ßi-1'Cer (Fig. 22).

2.5.7. Sulfo-globo-pentaozilceramidul

Dintr-un extract lipidic provenit din rinichi uman a fost izolat un GSL sulfatat (Fig.23). Spectrul în IR al compusului era similar gangliotriaozilceramid sulfatului, cu excepţia că a prezentat absorbţii mai pronunţate la 3100-3600 cm^{-1} (grupări hidroxil) şi 1060 cm^{-1} (C-OH) relative la 2920 şi 2840 cm^{-1} (-CH_2-). Absorbţiile la 1240 (întindere S=O) şi 810 cm^{-1} (vibraţie

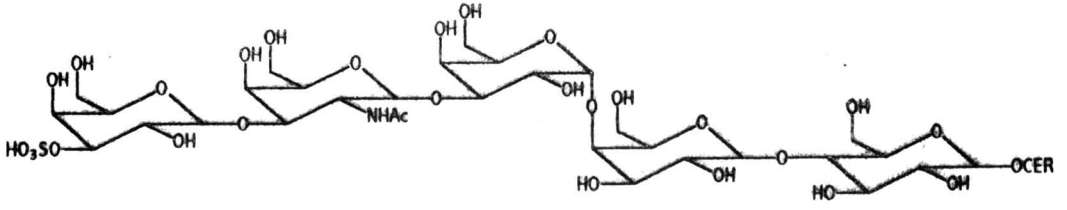


Fig. 23.Globopentaozil-ceramid sulfatat din rinichi uman.

C-O-S) au fost atribuite unei grupări ester sulfat ecuatoriale a hexozei.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Absența absorbțiilor la 850 și 1740 cm^{-1} a sugerat că compusul nu posedă grupări ester sulfat axiale și nici grupări carboxil ester. Absorbția la 890 cm^{-1} a indicat prezența a cel puțin unei configurații ß anomere a hexopiranozidului.

Analiza compozițională a indicat că sulfo-glicosfingolipidul conține Gal, Glc și GalNAc în raportul molar 3:1:1. AG majori sunt, în ordinea scăzătoare a procentelor: acidul hexadecanoic, acidul tetracosanoic, acidul docosanoic și acidul octadecanoic. Nu au putut fi detectați 2-hidroxi AG. BCL constituente sunt: 4-sfingenina și 4-hidroxisfinganina. Din deplasările chimice și constantele de cuplare (Tabelul 32) ale spectrului RMN ^1H pentru sulfo-GSL s-a dedus că acesta conține o α-hexoză, trei ß-hexoze, și o ß-N-acetilhexozamină. Apartenența la seria globo a fost dedusă din semnalul triplet al H-5 al α-galactozei (4,12 ppm).

Tabelul 32. Deplasările chimice și constantele de cuplare ale protonilor din globopentaozilceramidul sulfatat (SGb5) izolat din rinichi uman.

Glicolipid		Deplasarea chimică				
		Galß1-3	GalNAcß1-3	Galα1-4	Galß1-4	Glcß1-1'Cer
GL-5[a]	H-1	4,20	4,61	4,80	4,26	4,17
GL-7[a]	H-1	4,24	4,57	4,81	4,26	4,19
SGb5	H-1[b]	4,325	4,615	4,828	4,27	4,183
	H-1[c]	4,319	4,584	4,804	4,26	4,184 (4,194)[d]
	H-2[e]	3,48	3,88	3,78	3,30	3,047
	H-3[e]	3,93	3,69	3,62	3,45	3,37
	H-4[e]	3,974	3,861	3,974	3,818	3,30

Glicolipid		Constanta de cuplare				
GL-5[a]	$J_{1,2}$	7,3	8,3	3,9	7,3	7,3
GL-7[a]	$J_{1,2}$	7,8	8,3	2,9	7,8	8,3
SGb5	$J_{1,2}$[e]	7,8	8,3	3,9	7,3	7,8
	$J_{1,2}$[f]	7,8	8,3	3,4	6,8	7,3 (7,8)[d]
	$J_{2,3}$[f]	9,2	8,8	7,1	8,6	7,8
	$J_{3,4}$[f]	3,9	3,9	3,7	2,0	6,6

a, GL-5 este globopentaozilceramid (Gb5Cer); GL-7 este V^{3}αNeuAc-Gb5Cer;
b, precizia ± 0,001 ppm
c, precizia ± 0,001 ppm
d, semnalul H-1 al ß-Glc atașate la 4-hidroxisfinganina
e, precizia ± 0,49
f, precizia ± 0,49

ß-Glucoza din sulfo-GSL este legată direct la ceramid după cum rezultă din semnalul triplet al H-2 din ß-glucoză la 3,047 ppm. Aria peak-ului lui H-5 din sfingenină în regiunea

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

olefinică este aproximativ 66% din cele ale protonilor anomeri, ceea ce este în acord cu procentul de 4-sfingenina obținut prin CGL.

Conținutul de ester sulfat al sulfo-GSL, determinat comparativ cu al cerebrozid-sulfatului, a indicat că este vorba despre un glicolipid monosulfatat. Această concluzie a fost susținută și de eluția compusului de la DEAE-Sephadex.

Analiza SM cu ioni secundari negativi a indicat următoarele. Ionii pseudomoleculari intenși (M minus H)$^-$ au fost detectați la m/z 1551, 1579, 1593 și 1611, corespunzători speciilor ceramidice majore: 22:0, 24:0, 25:0 plus 4-sfingenină și 25:0 plus 4-hidroxi-sfinganina. Dintre aceștia, cel mai proeminent peak l-a dat acidul tetracosanoic și 4-sfinge-nina (m/z 1579). Totodată au fost obținute fragmente ionice caracteristice datorate clivării secvențiale a legăturilor glicozidice. A fost observat ionul datorat hexozei terminale sulfatate la m/z 241 (HSO_3-Hex minus 2H)$^-$. Peak-ul cu m/z 444 era derivat din dizaharidul terminal nereducător cu o grupare ester sulfat (HSO_3-Hex-O-HexNAc minus 2H)$^-$. Similar, au fost observați ioni la m/z 606 și 622 (trizaharid sulfatat), m/z 768 si 784 (tetrazaharid sulfatat), și m/z 946 (pentazaharid sulfatat). Aceste date sugerează că sulfo-GSL din rinichi uman posedă o catenă neramificată cu o grupare ester sulfat pe hexoza de la capătul nereducător terminal. Rezultatele sunt sintetizate în Fig. 24.

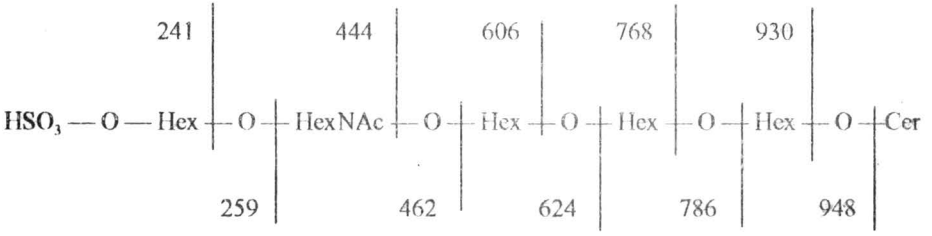


Fig. 24.Spectrometria de masă cu ioni secundari negativi a sulfo-globolipidului din rinichi uman.

Analiza de permetilare a GSL sulfatat a dus la următorii acetați: 2,4,6-tri-O-metilgalactitol, 2,3,6-tri-O-metilgalactitol, 2,3,6-tri-O-metilglucitol, 4,6-di-O-metil-2-deoxi-2-N-metil-2-acetamidogalactitol în raportul molar 2:1:1:1.

Substituția grupării sulfat pe Gal terminală în poziția 3 a fost confirmată prin metilare-solvoliză-remetilare. Pentru aceasta, GSL sulfatat din rinichi uman a fost permetilat, solvolizat pentru a îndepărta gruparea ester sulfat și remetilat cu C^2H_3I pentru a marca poziția de substituție a grupării sulfat pe Gal. Desulfatarea și remetilarea sulfo-GSL permetilat a dus la dispariția a un mol de 2,4,6-tri-O-metilgalactitol și apariția a un mol de 2,3,4,6-tetra-O-metilgalactitol. Apariția de 2,4,6-tri-O-metil-3-O-deuteriometilgalactitol acetat a stabilit că gruparea sulfat este atașată pe C-3 a Gal terminale nereducătoare.

Din analiza spectroscopică RMN COSY a rezultat următoarele. Regiunea spectrală a protonilor anomeri a indicat prezența a cinci monozaharide. Un dublet cauzat de rezonanța H-1 la 4,184 ppm ($J_{1,2}$ = 7,3 Hz) cuplat cu rezonanțele lui H-2 la 3,047 ppm ($J_{2,3}$ = 7,8 Hz), și un dublet la 4,26 ppm ($J_{1,2}$ = 6,8 Hz), în spectrul bidimensional COSY, au fost atribuite unui rest de ß-Glc și unui rest de ß-Gal din cadrul lactozei legate la Cer. In spectrul monodimensional, semnalul ßGlc era mai mic decât a celorlalte peak-uri anomere. In plus a mai fost detectat un mic dublet, într-o poziție ușor deplasată downfield (4,194 ppm; $J_{1,2}$ = 7,8 Hz) (Tabelul 32). Pare e: trem de probabil că semnalul ßGlc a fost scindat, ceea ce reflectă tipul de BCL la care este legată glucoza. Astfel, s-a observat că protonul H-1 din GalCer conținând 2-hidroxi-AG este deplasat downfield cu 0,04 ppm, în comparație cu GalCer conținând AGN; s-a sugerat că deplasarea downfield a protonului anomer al Gal se datorează unei interacții spațiale cu fragmentul ceramidic, mai precis cu gruparea 2-hidroxi a AG. Prin analogie, o grupare hidroxi suplimentară de pe 4-hidroxisfinganina

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

ar putea cauza o deecranare anizotropă protonului anomer al Glc, deşi deplasarea downfield este mai mică: 0,01 ppm. Această presupunere este susţinută de valoarea raportului intensităţilor (4:6) celor doi dubleţi (4,194 şi 4,184 ppm) ai ßGlc, raport care este în acord cu compoziţia în BCL a sulfo-GSL: t18:0, 31% si d18:1, 69%. O pereche de semnale cauzate de rezonanţa H-1 la 4,584 ppm ($J_{1,2}$ = 8,3 Hz) este o dovadă pentru prezenţa ßGalNAc. Rezonanţa de la 4,319 ppm ($J_{1,2}$ = 7,8 Hz) a fost atribuită unui rest de sulfo-3Galß legată pe C-3 a GalNAc. Semnalul dat de H-3 al acestui rest de Gal este deplasat puternic downfield: 3,93 ppm; valoarea deplasării downfield este de 0,48 ppm şi se datorează electronegativităţii grupării ester sulfat; valoarea 0,48 ppm a fost obţinută prin comparaţie cu semnalul H-3 al ßGal interne. Acest rezultat este în bun acord cu rezultatele obţinute pe alţi glicozizi sulfataţi, inclusiv cerebrozid-sulfatul. Deplasarea downfield a H-3 se explică printr-un efect de deecranare cauzat de gruparea ester sulfat asupra protonului geminal ecuatorial. Protonul anomer al Gal sulfatate este deasemenea deplasat downfield cu 0,125 ppm, în comparaţie cu Gb5Cer (Tabelul 24); cauza este tot gruparea sulfat din poziţia 3 şi s-a observat acelaşi fenomen la: Gg3Cer II^3-sulfat, Gg3Cer II^3,III^3-bis-sulfat, Gg4Cer II^3,IV^3-bis-sulfat şi Gg4Cer IV^3-sulfat. Dubletul suplimentar din poziţia extremă downfield (4,804 ppm) şi o constantă de cuplare vicinală ($J_{1,2}$ = 3,4 Hz) sunt compatibile cu un rest Galα legat la C-4 a unui rest Gal, care rezonează la 4,791-4,88 ppm. Aceşti parametri RMN ai regiunii anomere a sulfoglobopentaozil-ceramidului coincid cu cei ai Gb5Cer şi ai V^3αNeuAc-Gb5Cer. În plus, prezenţa unui proton H-5 atribuit Galα1-4, prin intermediul semnalului de la 4,117 ppm, arată că sulfo-GSL din rinichi uman aparţine seriei globo. Rezultatele de mai sus arată că structura glicosfingolipidului sulfatat din rinichi uman este următoarea: HSO_3–3Galß1-3GalNAcß1-3Galα1-4Galß1-4Glcß1-1'Cer (K. Nagai si colab., 1989).

2.5.8. Glicosfingolipide sulfatate pe bază de acid glucuronic

În ţesutul nervos periferic uman au fost identificaţi antigeni glicolipidici acizi care au fost recunoscuţi de către IgM a pacienţilor cu neuropatii periferice şi cu anormalităţi celulare (A. A. Ilyas şi colab., 1984). Glicolipidele respective au fost recunoscute deasemenea de către anticorpul HNK-1 (anti-Leu-7) elaborat faţă de un antigen membranar din linia de celule T HSB-2 (A. A. Ilyas şi colab., 1984). Ulterior glicolipidele respective au fost izolate şi caracterizate chimic (K. H. Chou şi colab., 1986; T. Ariga şi colab., 1987). Elucidarea structurii lor s-a bazat pe analiza glucidică, hidroliza enzimatică, hidroliza acidă menajată, permetilare, SM-FAB, spectroscopie RMN. O particularitate evidentă a acestor compuşi este prezenţa unei unităţi monomere de acid glucuronic sulfatat la C-3, la capătul nereducător al unui oligoglucid de tip neolacto. Acest tip de glican pare să dobândească o importanţă crescândă în neurobiologie şi glicobiologie. Astfel, moleculele de adeziune celulară, L1 şi N-CAM, glicoproteina J1 şi glicoproteina asociată mielinei (MAG) prezintă deasemenea un epitop carbohidrat cu structură similară recunoscut de către anticorpii monoclonali L2 şi HNK-1. Aceste rezultate sugerează că epitopul este implicat în adeziunea nerv-astrocit şi astrocit-astrocit, acţionând ca ligand în interacţia celulă-celulă.

Glicosfingolipi respective au fost obţinute şi prin sinteză (T. Nakano şi colab., 1993). Ele au următoarele structuri: D-GlcApß1-3-D-GalNAcpß1-4-D-GlcNAcpß1-3-D-Galpß1-4-D-Glcpß1-1'Cer (i); HO_3S-3-D-GlcApß1-3-D-GalNAcpß1-4-D-GlcNAcpß1-3-D-Galpß1-4-D-Glcpß1-1'Cer (ii); D-GlcApß1-3-D-GalNAcpß1-4-D-GlcNAcpß1-3-D-GalNAcpß1-4-D-GlcNAcpß1-3-D-Galpß1-4-D-Glcpß1-1'Cer (iii); HO_3S-3-D-GlcApß1-3-D-GalNAcpß1-4-D-GlcNAcpß1-3-D-GalNAcpß1-4-D-GlcNAcpß1-3-D-Galpß1-4-D-Glcpß1-1'Cer (iv). Pentru a înţelege corelaţiile RMN, unităţile monomere ale fracţiunii glucidice a compuşilor i şi ii au fost numerotate astfel:

D-GlcApß1-3-D- GalNAcpß1-4-D-GlcNAcpß1-3-D-Galpß1-4-D-Glcpß1-
e d c b a

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Iar a compuşilor iii şi iv astfel:

D-GlcApβ1-3-D-GalNAcpβ1-4-D-GlcNAcpβ1-3-D-GalNAcpβ1-4-D-GlcNAcpβ1-3-D-Galpβ1-4-D-Glcpβ1-
g f e d c b a

Caracteristicile RMN protonice ale celor patru compuşi de mai sus sunt următoarele (toate spectrele au fost elaborate în DMSO hexadeuterat-D_2O, 49:1, la 60 °C): pentru glicolipidul i: δ 5,555 (1H, dt, J 15,0 şi 7,3 Hz, H-5Cer), 5,372 (1H, dd, J 15,0 şi 7,3 Hz, H-4Cer), 4,681 (1H, d, J 7,6 Hz, H-1c), 4,368 (1H, d, J 7,6 Hz, H-1e), 4,317 1H, d, J 7,6 Hz, H-1b sau 1d), 4,279 (1H, d, J 7,3 Hz, H-1b sau 1d), 4,174 (1H, d, J 7,6 Hz, H-1a), 1,832 (3H, s, NAc), 0,854 (6H, t, $2CH_2$); pentru glicolipidul ii: δ 5,541 (1H, dt, J5,0 şi 7,0 Hz, H-5Cer), 5,372 (1H, dd, J 15,0 şi 7,0 Hz, H-4Cer), 4,675 (1H, d, J 8,2 Hz, H-1c), 4,514 (1H, d, J 7,6 Hz, H-1e), 4,310 (1H, d, J 7,6 Hz, H-1b sau 1d), 4,280 (1H, d, J 7,3 Hz, H1b sau 1d), 4,172 (1H, d, J 7,9 Hz, H-1a), 3,995 (1H, t, J 9,1 Hz, H-3e), 1,827 (3H, s, NAc), 0,856 (6H, t, J 6,8Hz, $2CH_2CH_3$); pentru glicolipidul iii: δ 5,558 (1H, dt, J 15,4 şi 7,0 Hz, H-5Cer), 5,375 (1H, dd, J 15,4 şi 7,0 Hz, H-4Cer), 4,688 (2H, d, J 8,1 Hz, H-1c, 1e), 4,369 (1H, d, J 7,7 Hz, H-1g), 4,318 (1H, d, J 7,7 Hz, H-1b, 1d sau 1f), 4,283 (2H, d, 7,7 Hz, H-1b, 1d sau 1f), 4,174 (1H, d, J 7,7 Hz, H-1a), 0,856 (6H, t, J 7,0 Hz, $2CH_2CH_3$); pentru glicolipidul iv: δ 5,605 (1H, dt, J 5,4 şi 7,0 Hz, H-5Cer), 5,423 (1H, dd, J 15,4 şi 7,0 Hz, H-4Cer), 4,730 (2H, d, J 7,7 Hz, H-1c şi 1e), 4,553 (1H, d, J 7,7 Hz, H-1g), 4,359 (1H, d, J 7,3 Hz, H-1b, 1d sau 1f), 4,332 (2H, d, J 7,3 Hz, H-1b, 1d sau 1f), 4,221 (1H, d, J 7,7 Hz, H-1a), 4,039 (1H, t, J 8,8 Hz, H-3g), 0,905 (6H, t, J 7,3 Hz, $2CH_2$ CH_3.

2.6. Metabolismul glicosfingolipidelor

Anumite aspecte ale semnificaţiei biologice a gangliozidelor sunt dezvăluite din studiul metabolismului acestor compuşi. Dovezile experimentale şi consideraţiile teoretice asupra metabolismului gangliozidelor sunt sistematizate după cum urmează.

Biosinteza N-acilsfingozinei (ceramidului). Biosinteza glicosfingolipidelor începe cu condensarea serinei cu palmitoil-CoA, care este catalizată de către serin palmitoil transferaza piridoxal fosfat-dependentă, obţinându-se 3-cetosfinganina. Compusul cetonic este redus ulterior la sfinganină de către o reductază NADPH-dependentă. Există dovezi că introducerea legăturii duble 4-trans se realizează după formarea legăturii amidice cu acidul gras; în felul acesta sfingozina nu constituie un intermediar al biosintezei *de novo*.

Toate etapele enzimatice implicate în biosinteza ceramidului sunt localizate pe faţa citosolică a reticulului endoplasmatic.

Următoarea etapă a biosintezei GSL şi a gangliozidelor si sulfatidelor, glucozilarea ceramidului, este localizată în aparatul Golgi. S-a arătat că ceramidul este glicozilat de către glucozil-transferaza iar această enzimă este accesibilă dinspre latura citoplasmatică a vezicu-lelor Golgi. Etapa următoare, formarea LacCer, un precursor comun al celor mai multe familii de GSL, are loc deasemenea pe latura citosolică a aparatului Golgi.

Adiţia secvenţială de resturi de monoglucide sau de AS la catena oligozaharidică, obtinându-se GM3 si gangliozide mai complexe, este catalizata de catre glicoziltransferaze legate de membrana, care s-au aratat a fi limitate la suprafata luminala a aparatului Golgi. Prin urmare este necesar un transfer al LacCer de pe latura citosolică pe latura luminală a membranelor Golgi; experimental, acest transfer a fost demonstrat numai parţial.

2.6.1. Biosinteza gangliozidelor

Schema biosintezei gangliozidelor (Fig. 25) (H. Iber şi colab., 1989; K. Sandhoff şi colab., 1990) integrează o serie de rezultate de chimie şi biochimie şi a fost confirmată experimental în cea mai mare parte (H. K. M. Yusuf şi colab., 1983; S. Sonderfeld şi colab., 1985;

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

G. Pohlentz şi colab., 1988). Cunoaşterea structurii gangliozidelor a permis, luând în considerare şi rolul a diferite coenzime nucleotidice (CMP-NANA, UDP-GAL, UDP-GalNAc, UDP-Glc, GDP-Fuc), elaborarea unor scheme ipotetice de biosinteza (S. Ando şi R. K. Yu, 1979). Concomitent au fost evidenţiate şi studiate glicozil-transferazele specifice care catalizează biosinteza catenei oligozaharidice (T. W. Keenan şi colab., 1974; C. M. Eppler şi colab., 1980).

Biosinteza gangliozidelor. Au fost biosintetizate, în primul rând, gangliozidele GM2 şi GM1a iar ulterior GD3 şi GD1a. Ca sistem enzimatic au fost utilizate membrane Golgi intacte (care nu au fost supuse dezintegrării prin îngheţ-dezgheţ sau prin tratare cu un detergent) din ficat de şobolan. Prin determinări relative s-a constatat că activitatea specifică de biosinteză în aceste organite Golgi, separate prin ultracentrifugare, era de 50-60 de ori mai mare decât în omogenatul total sau în microzomi, atât pentru activitatea de transfer a glucidelor neutre cât şi a acidului sialic. Amestecul de incubare pentru GM2 sintază conţinea, pe lângă emulsionant (octilglucozid sau fosfatidil glicerol (PAG)) şi ioni metalici (Mn^{2+} sau Mg^{2+}):

- GM3 ca precursor
- CDP-colină
- membrane Golgi
- UDP-(^{14}C)GalNAc

Amestecul de incubare pentru GM1a sintază era identic ca mai sus cu excepţia că:

- GM2 era utilizat ca precursor
- UDP-(^{14}C)Gal constituia donorul glucidic

Amestecul de incubare pentru GD3 sintază şi GD1a sintază conţinea respectiv:

- GM3, respectiv GM1a ca precursori
- proteina Golgi
- CMP-(^{14}C)NeuAc, ca donor de acid sialic

S-a constatat că PAG, într-o măsură mai pronunţată decât alte fosfolipide (fosfatidil-etanolamina, fosfatidil-inozitol) joacă un rol activator asupra GM2 sintazei. În cazul biosintezei lui GM1a (GM2: UDP-Gal galactoziltransferază) PAG este deasemenea activator. In schimb GD3 sintaza precum şi enzima care catalizează sinteza lui GD1a (GM1a: CMP-NeuAc sialiltransferaza) sunt activate puţin sau deloc de către PAG.

Biosinteza gangliozidelor este inhibată de către antibioticul tunicamicină; acţiunea inhibitorie a tunicamicinei putea fi atenuată cu PAG. Trebuie subliniat că atât acţiunea inhibitorie a tunicamicinei cât şi prevenirea ei cu PAG erau condiţionate de integritatea veziculară a membranelor Golgi; după ultrasonicare efectele erau cu totul altele. Concluzia a fost că ar putea exista un sistem de transport responsabil pentru transportul nucleotid-glucidului sau acceptorului prin membrana Golgi şi că PAG stabilizează şi/sau stimulează, în timp ce tunicamicina blochează, aceşti transportori. Acţiunea activatoare a fosfolipidelor nu se datorează unui efect asupra fluidităţii membranei. Aceste rezultate precum şi cele obţinute din studii cinetice arată că stimularea sintezei gangliozidelor de către PAG este cel mai probabil datorată nu stimulării directe a enzimei de către fosfolipid ci unui alt mecanism. Faptul ca inhibiţia biosintezei gangliozidelor de către tunicamicină este complet absentă când veziculele Golgi sunt solubilizate cu detergent arată că antibioticul nu inhibă glicozil-transferazele.

Biosinteza gangliozidelor a fost studiată şi prin utilizarea fibroblaştilor proveniţi de la bolnavi suferind de gangliozidoza GM2. Pentru aceasta, gangliozidul GM2, marcat cu tritiu la baza sfingoidă, a fost adăugat la mediul de cultură al fibroblaştilor normali şi respectiv cu gangliozidoza GM2. S-a găsit că gangliozidul se adsoarbe rapid la suprafaţa celulară, cu toate acestea cea mai mare parte din el poate fi îndepărtat prin tripsinizare. S-a constatat că o parte din gangliozidul încorporat după 48 h rezistă tratamentului cu tripsină. Viteza de adsorbţie şi încorporare depinde de concentraţia serului de vitel fetal în mediu; totuşi, concentraţii mai înalte de ser sunt inhibitoare.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Lipidele au fost extrase după timpi de incubare variabili, şi separate prin CSS. În cazul celulelor normale au fost identificaţi o serie de produşi de degradare printre care şi sfingenină. În cazul celulelor cu gangliozidoza GM2 au fost găsite numai urme de astfel de compuşi (în principal GA2).. Dimpotrivă, gangliozidele superioare GM1a şi GD1a erau formate, în celulele normale şi patologice, în cantităţi comparabile. Adăugarea, la celulele cu gangliozidoză GM2 (varianta AB; v. mai departe Catabolismul gangliozidelor) de proteină activatoare-GM2 restabilea degradarea aproape la nivelul normal a gangliozidului GM2 dar nu avea nici un efect asupra glicozilării lui la gangliozidele GM1a şi GD1a. Din aceste rezultate s-a conchis că biosinteza gangliozidelor superioare pornind de la GM2 poate avea loc prin glicozilare directă şi nu exclusiv *via* degradare lizozomală şi resinteză din produşi de degradare conţinând ^{3}H-sfingozină. Studii preliminare cu subfracţii celulare, la diferiţi timpi de încorporare a ^{3}H-gangliozidului, indică o cinetică bifazică a transportului net a gangliozidului, inserat în membrană, spre lizozomi. Aceasta cinetică este compatibilă cu ideea că o parte a glicolipidelor pot evita lizozomii secundari şi să migreze în compartimentul Golgi sau pe suprafaţa celulară.

Sialosilarea ^{3}H-gangliozidului GM1a exogen la GD1a a fost descrisă de către Ghidoni et al (1983) pentru ficatul de şoarece. Comparând rezultatele obţinute cu GM1a marcat fie la baza sfingoidă fie pe Gal terminală, s-a observat că numai o treime din ^{3}H-GD1a s-a format prin sialosilarea directă a GM1a, iar restul a fost sintetizat din produşii de degradare. Deoarece în acest caz gangliozidul a fost injectat la animale vii, după care au fost analizaţi ficaţii în întregime, aceste rezultate nu pot fi comparate cu cele obţinute pe culturi de celule.

Biosinteza glicolipidelor GA2, GA1, GM1b şi GD1c a fost studiată în vezicule Golgi izolate din ficat de şobolan. Când veziculele Golgi erau incubate cu LacCer şi UDP-(^{14}C)GalNAc, se obţinea un produs care comigra cu GA2 nemarcat autentic. Pentru o caracterizare suplimentară a GA2, experimentul a fost repetat cu (^{3}H)LacCer (tritiat în fragmentul ceramidic) şi UDP-GalNAc nemarcat; s-a observat deasemenea comigrarea produsului cu GA2 autentic. Incubarea ^{3}H-GA2 cu ß-hexozaminidaza A a arătat că acesta era hidrolizat la (^{3}H)LacCer, după cum (^{3}H)GM2 era hidrolizat la (^{3}H)GM3 în aceleaşi condiţii. S-a tras concluzia că o N-acetilgalactozaminil transferază prezentă în preparatele Golgi catalizează sinteza GA2.

Incubarea veziculelor Golgi din ficat de şobolan cu GA2 şi UDP-(^{14}C)Gal a dus la un produs care comigra cu GA1 autentic. ^{3}H-GA1 a fost obţinut prin incubarea veziculelor Gol-gi cu ^{3}H-GA2 şi UGP-Gal nemarcat. Hidroliza lui ^{3}H-GA1 cu ß-galactozidază dădea ^{3}H-GA2, după cum hidroliza lui ^{3}H-GM1 cu aceeaşi enzimă ducea la ^{3}H-GM2. Aceste rezultate arată că în ficatul de şobolan este prezentă o galactozil-transferază ce catalizează sinteza lui GA1.

Utilizarea lui GA1 ca acceptor în testarea sialiltransferazei a dus la obţinerea a doi produşi: unul migra puţin sub GM1a iar celălalt sub GD1a. Pentru caracterizarea celor doi produşi s-a utilizat GA1 marcat cu ^{14}C. Când (^{14}C)GA1 era incubat cu vezicule Golgi şi CMP-(^{14}C)NeuAc, se obţineau doi produşi, şi anume (^{14}C)GM1b şi (^{14}C)GD1c. Incubarea celor doi compuşi cu sialidază din *Clostridium perfringens* conducea la (^{14}C)GA1. In aceleaşi conditii GD1a dădea GM1a, prin urmare NANA situat la un rest de Gal "intern" nu este degradat de către sialidaza utilizată. Aceasta arată că structurile lui GM1b şi GD1c sunt, respectiv: NANAα2-3Galß1-3GalNAcß1-4Galß1-4Glcß1-1'Cer şi NANAα2-8 NANAα2-3Galß1-3GalNAcß1-4Galß1-4Glcß1-1'Cer. Structura lui GM1b a fost confirmată şi prin spectrometria de masă FAB: au putut fi detectate toate fragmentele ionice aşteptate. Pe de altă parte faptul că GD1c este biosintetizat de la GM1b a fost demonstrat prin observarea unui timp de decalaj între apariţia lui GM1b şi cea a lui GD1c în mediul de biosinteză. S-a conchis că aparatul Golgi din ficat de şobolan conţine două sialil-transferaze responsabile pentru sinteza lui GM1b şi GD1c

Inhibiţia competitivă (G. Pohlentz şi colab., 1988), utilizând ca substrate LacCer, GM3 şi GD3 (precum şi inhibitorii mutuali corespunzători: GM3 ca substrat, GD3 ca inhibitor şi viceversa, etc) a arătat că o singură gangliozid N-acetilgalactozaminil transferază, din vezicule

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Golgi din ficat de şobolan, transferă GalNAc la trei compuşi, rezultând GA2, GM2 şi, respectiv, GD2. Studii analoge cu GA1, GM1a şi GD1b ca acceptori pentru sialil transferază au indicat că GM1b-, GD1a- şi GT1b-sintazele sunt identice. Alte experimente de acelaşi tip au sugerat că aceeaşi enzimă transferă Gal la GA2, GM2 şi GD2, conducând respectiv la compuşii: GA1, GM1a şi GD1b. Toate aceste rezultate sunt integrate în schema din Fig 25.

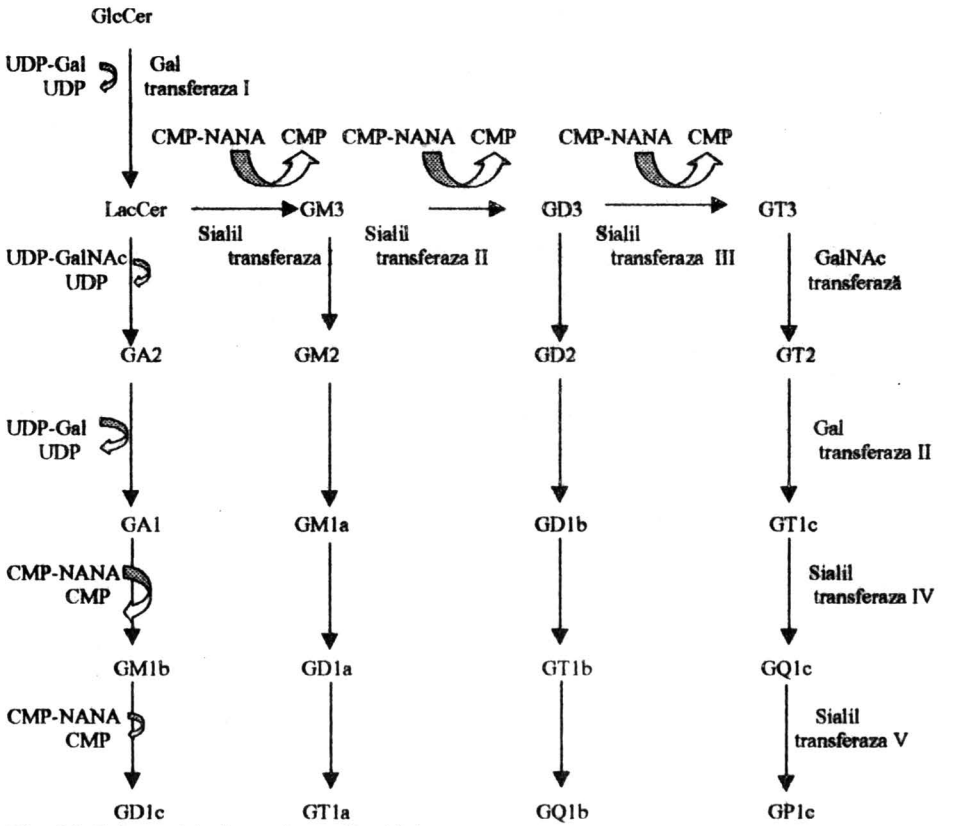


Fig. 25. Schema biosintezei gangliozidelor.

2.6.1.1. Specificitatea de substrat

Specificitatea de substrat a fost studiată în cazul a două enzime-cheie din biosinteza gangliozidelor, GM2- şi GD3-sintaza, ambele având ca substrat gangliozidul GM3. Cele două enzime direcţionează, pornind de la acelaşi substrat (GM3), biosinteza gangliozidelor în seriile a şi b de gangliozide (D. Klein şi colab., 1987).

Pentru a cunoaşte specificitatea de substrat au fost utilizate ca acceptori glicolipidici GM3 şi derivaţi ai lui GM3 (Tabelul 33). Derivaţii lui GM3 care au fost sintetizaţi şi utilizaţi ca substrat pot fi împărţiţi în trei grupuri:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Tabelul 33. Derivaţi ai gangliozidului GM3.

R^{1*}	R^{2**}	R^{3***}	Derivaţi
Tetracosanoil	OH	acetil	GM3
H	OH	acetil	lizo-GM3
Acetil	OH	acetil	N-acetil-lizo-GM3
Octanoil	OH	acetil	N-octanoil-lizo-GM3
Pirenil-dodecanoil	OH	acetil	N-pirenil-dodecanoil-lizo-GM3
Tetracosanoil	OH	H	Neu-LacCer
Tetracosanoil	OH	glicolil	NeuGc-LacCer
Tetracosanoil	OH	butiril	NeuBt-LacCer
Tetracosanoil	OH	biotinil	NeuBio-LacCer
Tetracosanoil	OCH_3	acetil	GM3 metil ester
Tetracosanoil	NH_2	acetil	GM3 amida
Tetracosanoil	$NHCH_3$	acetil	GM3 metilamida

* R^1 este radicalul legat la gruparea -NH- a sfingozinei
** R^2 se leagă la gruparea -C=O, în cadrul grupării carboxil, a AS
*** R^3 se leaga la gruparea -NH- a AS

Primul grup este alcătuit din GM3 cu diferite resturi de acid gras în fracţiunea ceramidică (derivaţi ai lui lizo-GM3), al doilea grup de derivaţi ai lui GM3 au diferite resturi N-acil în fracţiunea de acid neuraminic (derivaţi ai Neu-LacCer) şi al treilea grup, cărora le lipseşte sarcina negativă, au fost sintetizaţi modificând gruparea carboxil a restului de AS. Compararea activităţilor specifice obţinute cu aceşti derivaţi, precum şi a produşilor de reacţie cu a celor a acceptorului nativ GM3 au dat indicaţii în privinţa specificităţii de acceptor al GM2 şi GD3 sintazei. Când derivaţii GM3 au fost utilizaţi ca acceptori glicolipidici, activităţile specifice rezultate au fost exprimate ca procent din activitatea obţinută cu substrat GM3 autentic.

Derivaţi lizo-GM3. Cu derivaţi N-acil-lizo-GM3 ca acceptori glicolipidici, GM2 sintaza arată comportare diferită când Triton X-100 sau PAG sunt utilizaţi ca stimulatori (Tab. 34). În prezenţa Tritonului X-100 activitatea GM2 sintazei descreşte cu creşterea lungimii catenei restului de acid gras al substratului.

Tabelul 34.Activităţile GM2 sintazei care acţionează pe GM3 şi derivaţi ai acestuia, ca acceptori glicolipidici.

Acceptor	Activitatea în prezenţa		Produşi	
	Triton (%)	PAG (%)	GM2 (%)	GM2 derivat (%)
GM3	100	100	100	-
Lizo-GM3	28	10	-	100
N-Acetil-lizo-GM3	160	16	-	100

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

N-Octanoil-lizo-GM3	122	40	-	100
N-1-Pirenil-dodecanoil-lizo-GM3	102	118	-	100
Neu-LacCer	55	28	-	100
NeuGc-LacCer	81	80	-	100
NeuBt-LacCer	88	60	-	100
NeuBio-LacCer	97	-	-	100
GM3 metil ester	13	58	90	10
GM3 amida	10	70	-	100
GM3 metil-amida	1	19	-	100

Pe de altă parte, în prezenţa PAG, activitatea enzimatică creşte cu creşterea lungimii catenei acil a substratului. Cu toate acestea, în ambele sisteme activitatea GM2 sintazei faţă de N-pirenil-dodecanoil-lizo-GM3 este comparabilă cu aceea faţă de GM3 autentic ca substrat. Lizo-GM3 este un slab acceptor în ambele sisteme. Această comportare neregulată a enzimei poate fi explicată presupunând o acţiune tip detergent a analogilor GM3 cu acizi graşi mai scurţi. Analiza cromatografică a produşilor de la dozarea GM2 sintazei a relevat că erau obţinuţi derivaţii lizo-GM2 aşteptaţi.

Când derivaţii N-acil-lizo-GM3 erau utilizaţi ca acceptori glicolipidici în dozarea GD3 sintazei, aceştia erau convertiţi la analogii GD3 corespunzători cu viteze de reacţie similare celor formaţi de la GM3 (Tab 35). Alături de GD3 radiomarcat aşteptat şi de derivaţii GD3 obţinuţi

Tabelul 35. Activităţile GD3 sintazei care acţionează pe GM3 şi derivaţi ai acestuia, ca acceptori glicolipidici.

Acceptor	Activitate	Produşi			
		GD3	GM3	GD3 der.	GM3 der.
	%				
GM3	100	94	6	-	-
Lizo-GM3	70	-	-	96	4
N-Acetil-lizo-GM3	120	-	-	88	12
N-Octanoil-lizo-GM3	101	-	-	94	6
N-1-Pirenil-dodecanoil-lizo-GM3	93	-	-	92	8
Neu-LacCer	1	24	76	-	-
NeuGc-LacCer	103	-	3	97	-
NeuBt-LacCer	58	-	6	94	-
NeuBio-LacCer	6	78	22	-	-
GM3 metil ester	10	94	6	-	-
GM3 amidă	11	2	6	92	-

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

GM3 metil-amidă	1	-	100*	-

* GM3- si GD3-metilamida sunt de nedistins cromatografic

prin glicozilarea GM3 autentic nemarcat şi respectiv a N-acil-lizo-GM3, au fost detectate deasemenea mici cantităţi de GM3 radiomarcat şi N-acil-lizo-GM3. Producerea lor poate fi explicată prin acţiunea succesivă a sialidazei şI a sialiltransferazei asupra acceptorilor nemarcaţi. Într-adevăr, în preparatele Golgi a putut fi detectată activitate sialidazică, în condiţii de incubare utilizate pentru dozarea sintazei, măsurând degradarea GM3 radiomarcat.

Derivaţi Neu-LacCer (GM3 cu modificări în gruparea 5-acetamido a fracţiunii de acid sialic). Tabelul 34 arată că în cazul GM2 sintazei toţi derivaţii Neu-LacCer acilaţi erau uşor recunoscuţi ca acceptori glicolipidici în prezenţa Triton X-100 precum şi în prezenţa PAG şi erau convertiţi la derivaţii GM2 corespunzători, după cum s-a relevat prin analiza cromatografică. Chiar restul voluminos biotinil din NeuBio-LacCer nu afecta activitatea enzimatică comparativ cu activitatea pe GM3 natural (NeuAc-LacCer). Totuşi, când se utiliza ca substrat Neu-LacCer cu o grupare liberă în restul de acid neuraminic, activitatea relativă a GM2 sintazei era de numai 55% indicând că acilarea grupării amino din restul de AS este obligatorie pentru ca acest substrat să fie efectiv recunoscut de către GM2 sintază.

GD3 sintaza nu arată vreo diferenţă în activitate când NeuAc-LacCer sau NeuGc-LacCer erau utilizate ca substrate glicolipidice (Tabel 35). Cu NeuBt-LacCer ca substrat, activitatea relativă a GD3 sintazei era de numai 58%. Derivaţii GD3 corespunzători au fost detectaţi cromatografic. Neu-LacCer şi NeuBio-LacCer nu au fost deloc recunoscute de către GD3 sintază (Tabel 35) deoarece nu au putut fi detectaţi derivaţii GD3 corespunzători.

GM3 cu modificări ale grupării carboxil a fracţiunii de acid sialic. Pierderea sarcinii negative a restului de AS a acceptorilor glicolipidici a dus la activităţi scăzute a GM2- precum şi a GD3 sintazei (Tab 34 şi Tab 35). Totodată, activităţile enzimatice erau influenţate de un efect spaţial. Acest lucru a fost atestat prin compararea activităţilor acestor enzime pe GM3 amida şi GM3 metilamida ca acceptori. În plus faţă de pierderea sarcinii, gruparea metil a ultimului compus determină o descreştere chiar mai bruscă a activităţilor sintazice decât s-a observat în cazul GM3 amidei.

Activităţile GM2 sintazei când erau utilizaţi ca acceptori derivaţi GM3 neîncărcaţi, erau diferite în probe conţinând Triton X-100 şi respectiv PAG. Analiza cromatografică a produşilor de reacţie a relevat în ambele sisteme de dozare că în condiţiile de reacţie ale GM2 sintazei esterul metilic al lui GM3 era parţial hidrolizat la GM3 care era glicozilat la GM2 radiomarcat; numai o cantitate mică de ester metilic GM2 era detectabilă. GM3 amida şi GM3 metilamida erau convertite la analogii GM2 corespunzători; de remarcat că ultima era convertită cu o viteză de reacţie scăzută.

Când erau utilizaţi, ca substrate pentru GD3 sintază, derivaţi GM3 neîncărcaţi electric, se obţineau rezultate similare. Analiza cromatografică a arătat că esterul metilic GM3 era parţial hidrolizat la GM3, care în condiţiile de reacţie era sialosilat la GD3 radiomarcat. Esterul metilic GM3 şi GM3 metilamida erau într-o măsură foarte scăzută substrate pentru GD3 sintaza iar analogii GD3 corespunzători abia puteau fi detectaţi. Numai în cazul GM3 amidei ca acceptor glicolipidic s-a găsit o cantitate considerabilă din derivatul GD3 corespunzător.

Găsirea GM3 radiomarcat, când GM3 nemarcat era utilizat ca acceptor în dozarea GD3 sintazei, a fost deja explicată prin acţiunea succesivă a sialidazei şi sialiltransferazei.

În alte experimente au fost utilizaţi ca acceptori glicolipidici amidele lui GM2 şi GM1a în dozarea GM1a sintazei şi respectiv GD1a sintazei. GM1 amida era formată de la GM2 amidă cu activităţi enzimatice similare cu formarea lui GM1 de la GM2. Astfel în cazul GM1 sintazei pare

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

să nu fie deloc importantă sarcina negativă a moleculei de substrat. Cînd GM1 amida era substrat pentru GD1a sintază s-a format GD1a amidă. Pierderea sarcinii negative a substratului conducea la o activitate enzimatică mai ridicată decât formarea în aceleaşi condiţii a lui GD1a de la GM1.

Rezultatele cu privire la specificitatea GD3- şi GM2 sintazei pot fi rezumate după cum urmează.

a.Activitatea ambelor enzime prezintă o dependenţă pronunţată de N-acilarea grupării amino sfingoide a moleculei GM3.

b.Gruparea acil legată la gruparea amino a restului de acid sialic a lui GM3 pare a fi lipsită de importanţă pentru activitatea GM2 sintazei, după cum rezultă din lucrările de specialitate. Dimpotrivă, activitatea GD3 sintazei este cât se poate de dependentă de mărimea acestui rest acil.

c.Sarcina negativă a grupării carboxilice a fracţiunii de acid sialic din GM3 este foarte importantă pentru activitatea GD3 sintazei dar este mai puţin importantă pentru GM2 sintază. Totuşi ambele enzime par a fi cât se poate de sensibile în privinţa mărimii acestei regiuni a moleculei de GM3.

In timpul investigaţiilor respective asupra specificităţii enzimatice au fost utilizate ca substrate pentru o neuraminidaza bacteriană derivaţi GM3. S-a găsit că modificări în molecula lui GM3, care au făcut ca derivaţii GM3 să fie substrate mai puţin adecvate pentru GD3 sintază, au făcut ca aceste substanţe să fie substrate mai puţin adecvate pentru neuraminidază.

Specificitatea de substrat a sulfotransferazei. S-a realizat purificarea şi s-a studiat specificitatea de substrat a sulfotransferazei utilizând GalSph şi GalCer conţinând ω-AG, în stare liberă şi imobilizată. Pentru aceasta s-a pornit de la GalCer purificat din creier porcin, iar cele două tipuri de GSL (cu AGH şi AGN) au fost separate prin cromatografie pe coloană pe Silicagel. A urmat îndepărtarea AG din GalCer şi înlocuirea acestuia cu acid ω-amino n-hexanoic sau cu acid ω-amino n-dodecanoic care au servit la imobilizarea GalCer respective. GalSph a fost preparată din GalCer prin hidrazinoliză (N. Kato şi colab., 1991). ω-AminoAG a fost grefat prin intermediul derivatului N-trifluoroacetil-ω-amino AG sub formă de clorură acidă, obţinută prin reacţia cu clorură de tionil. GalCer parentale, precum şi compuşii intermediari au fost caracterizaţi prin spectroscopie RMN ^1H (Tabelul 36) şi prin FAB-MS. Spectrele RMN de proton

Tabelul 36.Deplasarea chimică (ppm) a unor GalCer şi a unor derivaţi ai acestora

Compus	ß-Gal	Sfingozină			Acid gras	
	H-1	H-3	H-4	H-5	H-2	Amidă
GalCer AGH	4,107	4,025	5,406	5,588	2,261	7,188
GalCer AGN	4,072	4,025	5,406	5,588	2,049	7,163
GalSph	4,176	4,294	5,482	5,753		
GalSph-$COC_5H_{10}NHTFAc$*	4,082	3,982	5,410	5,585	2,096	7,208
GalSph-$COC_5H_{10}NH_2$	4,095	4,016	5,440	5,612	2,122	b
GalSph-$COC_{11}H_{22}NHTFAc$	4,092	3,989	5,424	5,599	2,076	7,156
GalSph-$COC_{11}H_{22}NH_2$	4,091	3,996	5,425	5,601	2,081	7,178

* TFAc este trifluoroacetil.

ale intermediarilor de sinteză şi a amino GalCer au fost obţinute în DMSO hexadeuterat conţinând 2 N oxid de deuteriu la temperatura de 90°C pe un aparat RMN de înaltă rezoluţie. Deplasările chimice au fost indicate prin distanţele în ppm faţă de tetrametilsilan ca standard intern. Aminododecanoil-GalSph a fost imobilizată în mediu de DMSO pe Sefaroză activată cu BrCN. Cromatografia de afinitate a glicolipidsulfotransferazei a fost realizată la 4°C.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Membranele provenind din rinichi de şobolan au fost solubilizate în Lubrol PX şi aplicate pe o coloană de ω-amino-dodecanoil-GalSph-Sepharose. Eluţia enzimei s-a realizat cu un tampon conţinând NaCl 1N-3N.

S-a observat că reacţia de cuplare dintre clorura de Ntrifluoroacetilacilgras şi Gal Sph dă un randament mai bun decât condensarea Ntrifluoroacetil amino AG la Gal Sph în prezenţa carbodiimidei. S-a observat deasemenea posibilitatea de utiizare a (9 fluorenilmetil)-cloroformiat (Fmoc) în locul restului trifluoroacetil ca grupare pentru blocarea amino. Aceste grupări de blocare legate la restul amino primar erau îndepărtate rapid prin saponificare blândă, în timp ce gruparea N-acil rămânca nemodificată, rezultând aminoGalCer cu randamente bune. Procedeele prezente ar putea fi aplicate şi la sinteza altor glicolipide conţinând ω-aminoAG pornind de la lizoglicolipidele corespunzătoare.

Spectrele RMN parţiale ale lipidelor finale, împreună cu spectrul GalCer au dus la următoarele concluzii. Comparînd spectrele GalCer şi Gal Sph a rezultat că protonii olefinici cisoizi 5,321 ppm şi protonii α-metilenici la 2,261 ppm ai acidului gras din GalCer au dispărut din spectrul GalSph. În spectrul GalSph H-3 la 4,294 ppm precum şi protonii olefinici transoizi H-4 la 5,482 ppm şi H-5 la 5,753 ppm ai sfingozinei erau deplasaţi în mod caracteristic *downfield* în comparaţie cu semnalele corespunzătoare de la GalCer sau de la amino-GalCer sau de la derivaţii N-trifluoroacetil (Tabelul 36). Protonii α-metilenici ai acidului gras apăreau în spectrele derivaţilor N'-trifluoroacetil ai N-aminohexanoilGalSph şi N-aminododecanoilGalSph, indicând inserţia N'-trifluoroacetil amino acidului gras pe restul amino al Sph, prin reacţia de cuplare. Protonii metilenici erau reţinuţi după îndepărtarea grupării N'-trifluoro acetil. Masele moleculare ale intermediarilor şi amino GalCer au fost confirmate cu ajutorul analizei FAB-SM negative. Un ion pseudomolecular, m/z 460, a fost observat în cazul GalSph (M=461), cu toate că intensitatea sa a fost scăzută. Această intensitate joasă poate fi atribuită unei matrice neadecvate (glicerol). M/z 298 datorită $[M-Gal]^-$ nu a fost detectat în spectru. Cu toate acestea m/z 669 şi 507 datorită $[M-H]^-$ şi respectiv $[M-Gal]^-$ au fost în mod clar observate în cazul N-(N'-trifluoroacetil-aminohexanoil)GalCer (M=670). În mod similar au fost observate fragmentele ionice cu m/z 753 şi 591 datorate $[M-H]^-$ şi $[M-Gal]^-$ în cazul N-(N'-trifluoroacetil aminododecanoil)-GalCer (M-754). Îndepărtarea grupării N'-trifluoroacetil din speciile de aminoGalCer dădea m/z 573 şi 411 datorită ionilor $[M-H]^-$ şi $[M-Gal]^-$ pentru derivatul N-aminohexanoil (M=574) şi m/z 657 şi 495 datorită fragmentării derivatului N- amino-dodecanoil (M=658). Într-un mod mai puţin aşteptat m/z 609 şi 693 datorate $[M-H+2H_2O]^-$ au fost ambele observate în cazul amino GalCer la intensităţi înalte.

Activitatea sulfotransferazică a fost determinată prin utilizarea enzimei solubilizate din rinichi de şobolan şi aminoGalCer sintetice. Sulfotransferaza din rinichi de şobolan şi ser uman preferă GalCer conţinând AGH. Cele două amino GalCer aveau în aceeaşi măsură capacitatea de acceptor cu GalCer conţinând AGN, a cărui structură chimică era similară celei a amino GalCer. În ceea ce priveşte substratul acceptor solid, derivatul N amino dodecanoil imobilizat a fost deasemenea sulfatat. Similitudinea dintre GalCer (NAG) şi amino GalCer a permis utilizarea speciilor de aminoGalCer ca liganzi cromatografici de afinitate pentru sulfotransferază. Enzima din rinichi de şobolan este foarte eficace pentru purificare prin utilizarea aminododecanoilGalSph imobilizate. Printr-o singură cromatografie de coloană, pornind de la fracţia iniţială solubilizată, s-a obţinut un factor de purificare de 14.000 de ori cu un randament de 40%. Activitatea nelegată era uşor întîrziată pe coloană, indicând că enzima are afinitate pentru ligand şi că coloana are o capacitate de legare scăzută. Eluţia specifică cu Gal Cer sau cu Gal Sph a fost de asemenea încercată: randamentul era mai scăzut (10%) iar factorul de purificare era de numai 5000 de ori faţă de utilizarea ca eluant a NaCl; aceasta se explică prin solubilitatea insuficientă a acestor lipide la concentraţii scăzute (2%) de detergent utilizat pentru eluţie. AminoGalCer poate fi

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

deasemenea utilizată pentru a detecta alte proteine metabolice ale Gal Cer prin modificări chimice adecvate (K. Kamio şi colab., 1992).

2.6.2. Catabolismul gangliozidelor

Distribuţia unor enzime, implicate în metabolismul glicosfingolipidelor, în diferite ţesuturi animale este prezentată în Tabelul 37 (Silvia Iga şi colab., 1994).

Tabelul 37. Distribuţia exo-glicozilhidrolazelor în ţesuturile vertebratelor.

Ţesut	Enzimă			
	ß-Hexozaminidază*	ß-Galactozidază	α-Galactozidază	ß-Glucozidază
Testicul de cocoş	28,55	21,3	1,92	0,0
Plasmă seminală de cocoş	99,22	18,76	ND**	ND
Creier de ovine	8,1	1,02	0,67	0,53
Testicul de berbec	25,1	3,04	0,78	1,11
Plasmă seminală de vier	68,8	1,12	0,0	0,0
Testicul de broscoi	30,76	2,62	0,74	0,195
Rinichi de şobolan				
Cortex	66,15	19,45	4,76	1,5
Medulară	58,15	21,04	5,07	3,76

* Activitatea enzimatică pentru toate enzimele este exprimată în nmol p-nitrofenol x mg proteină$^{-1}$ x min^{-1} .
** ND, nedeterminată.

În celulele mutante, în care degradarea lizozomală a glicosfingolipidelor (GSL) este deficientă, se acumulează intermediari nedegradabili, de ex. gangliozidul GM2 în celulele Tay-Sachs.

Gangliozidele sunt degradate prin acţiunea secvenţială a exohidrolazelor dintre care cele mai multe sunt localizate în lizozomi (K. Sandhoff şi colab., 1987).

Cu toate acestea este încă neclar în care compartiment subcelular se realizează conversia oligosialogangliozidelor la monosialogangliozide. Sialidaze care clivează gangliozidele au fost localizate în membrana plasmatică (M. Ziegler şi G. Bach, 1981) îndeosebi în cea a neuronilor (C. L. Schengrund şi A. Rosenberg, 1970) şi mielinei, precum şi în lizozomi (F. W. Verheijen şi colab., 1985).

Contribuţia relativă a acestor enzime la degradarea oligosialogangliozidelor precum şi reglarea lor este necunoscută. Studii *in vitro* precum şi *in situ* pe culturi de celule sunt compatibile cu ideea că oligosialogangliozidele membranei neuronale precum şi ale celulei gliale pot fi convertite la monosialogangliozide de către sialidaza legată de membrana plasmatică (G. Scheel şi colab., 1982). Cu toate că studiile subcelulare indică faptul că această enzimă este o proteină a membranei plasmatice, pH-ul optim este în domeniul acid şi anume în jur de 4, la pH 6-7 având numai 20% din activitatea optimă. Ea are specificitate pentru îndepărtarea hidrolitică a resturilor sialil terminale ale legăturii α-cetozidice. Pe de altă parte specificitatea de substrat, proprietăţile moleculare şi modul de ancorare a sialidazei care clivează gangliozidele, în compartimentul lizozomal, sunt necunoscute.

Oligosialogangliozidele majore sunt convertite, prin acţiunea uneia sau ambelor enzime, la monosialogangliozidul GM1, al cărui rest sialil este rezistent faţă de acţiunea sialidazei mamaliene. (Numai cantităţi extrem de mici pot fi convertite la GA1).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Pe lângă enzima care degradează gangliozidele, lizozomii conţin o sialidază activă pe sialiloligozaharide (K. Mendla şi M. Cantz, 1984), a cărei deficienţă moştenită în mucolipidoza i nu afectează direct degradarea gangliozidelor. Conform studiilor din laboratorul lui Galjaard şi colab., (1985) această activitate sialidazică constituie parte integrantă dintr-un complex asociat membranei care este alcătuit dintr-o ß-galactozidază monomeră matură (deficienţa căreia duce la gangliozidoza GM1), o glicoproteină protectoare şi o subunitate matură a sialidazei. Rămâne neclară relaţia acestei sialidaze cu sialidaza din lizozomi care clivează gangliozidele şi care pare a fi deficientă în mucolipidoza IV.

Se presupune de obicei că toate celelalte etape catabolice în degradarea gangliozidelor se realizează în lizozomii secundari. Acest punct de vedere se bazează pe localizarea lizozomală a enzimelor respective şi pe acumularea lipidelor nedegradabile în corpusculi derivaţi din lizozomi în celulele şi ţesuturile deficiente într-o astfel de enzimă.

Produşii degradării lizozomale a GSL, cum ar fi monozaharidele, acizii graşi şi bazele sfingoide se presupune că părăsesc lizozomii fie pentru reutilizare în căile de biosinteză sau pentru degradare finală şi producere de energie. Reutilizarea acizilor graşi şi a bazelor sfingoide pentru biosinteza fosfolipidelor şi sfingolipidelor a fost deja demonstrată dar mecanismul prin care aceşti compuşi părăsesc compartimentul lizozomal nu a fost studiat în detaliu.

Enzimologia catabolismului gangliozidelor. O raţiune majoră pentru analiza degradării gangliozidelor a fost elucidarea bolilor de depozitare a sfingolipidelor. Primele dozări in vitro ale degradării enzimatice a GSL erau realizate în prezenţa detergenţilor. S-a făcut aceasta pentru a facilita interacţia substratului cu enzima prin solubilizarea moleculelor de substrat amfifil precum şi a enzimei catabolice dacă aceasta este legată de membrană sau asociată cu membrana. Cinetica obţinută în aceste condiţii era de obicei neregulată şi dificil de interpretat, specificitatea de substrat a enzimelor studiate variind apreciabil cu natura şi cantitatea detergentului utilizat. Prin urmare erau necesare condiţii de dozare pentru a studia interacţia substratelor lipidice cu enzima în absenţa detergenţilor (care nu sunt prezenţi în lizozomi).

În vivo GSL sunt componente membranare şi sunt expuse probabil ca atare sistemului catabolic. Pentru a simula această situaţie in vitro, GSL au fost inserate fie în bistraturi lipidice ale lipozomilor fie în acelea ale membranelor izolate şi utilizate ca substrate pentru enzima hidrolitică respectivă.

Până acum trei moduri de interacţiune enzimă-GSL au emanat din aceste studii.

1.Atât substratul cât şi enzima catabolizantă, sunt legate la aceeaşi foiţă a membranei şi interacţionează prin difuzie laterală după cum s-a studiat pentru hidroliza gangliozidului GD1a de către sialidaza legată de membrană.

2.Substratul GSL inserat în bistratul lipozomilor este atacat direct de către o hidrolază acvosolubilă după cum s-a studiat pentru hidroliza glucozilceramidului de către o ß-glucozidază acvosolubilă.

3.Substratul GSL expus ca un component al bistratului lipidic (sau ca micele) in vitro nu este recunoscut direct de către hidrolaza acvosolubilă ci necesită adăugarea unei proteine activatoare care facilitează interacţia enzimă-GSL.Aceasta situaţie este cunoscută pentru hidroliza gangliozidului GM2 de către hexozaminidaza A.

O serie de maladii metabolice rezultă din existenţa unor defecte enzimatice şi/sau a activatorului enzimatic (Tabelul 38).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Tabelul 38. Maladii metabolice care apar în cazul unor activităţi enzimatice defecte.

Maladia	Enzima defectă	Compusul acumulat; loc preferenţial de depozitare
Farber (Ceramidoza)	Ceramidaza	Ceramid; viscere şi creier
Niemann-Pick (Sfingomielinoza)	Sfingomielinaza	Sfingomielina; viscere şi creier (tipul A)
Gaucher (Glucocerebrozidoza)	Glucocerebrozid-ß-glucozidaza (Glucozilceramid-ß-glucozidaza)	Glucozilceramid; viscere şi creier (forma infantilă)
Krabbe (Galactocerebrozidoza)	Galactocerebrozid-ß-galactozidaza (Galactozilceramid-ß-galactozidaza)	Galactozilceramid; creier (substanţa albă)
Leucodistrofia metacromatică (Sulfatidoza); maladia Austin	Sulfatid-sulfataza (arilsulfataza A)	Sulfatid; creier (substanţa albă) şi nervi
Fabry	α-Galactozidaza A	Galα1-4GalCer şi Galα1-LacCer; organe viscerale
Gangliozidoza GM2, varianta B (Tay-Sachs)	Hexozaminidaza A	Gangliozid GM2; creier (substanţa cenuşie)
Gangliozidoza GM2, varianta 0	Hexozaminidazele A şi B	Gangliozidele GM2 si GA2; creier. Globozid; viscere
Gangliozidoza GM1	GM1-ß-galactozidaza	Gangliozid GM1; creier. Keratansulfat*; viscere

* Keratansulfatul este un mucopolizaharid constând din unităţi dizaharidice: Galß1-4(sulfo-6)GleNAc(ß1-3)

2.6.3. Localizarea celulară a glicosfingolipidelor

Studii de microscopie electronică, bazate pe tehnica de îngheţare-fracturare utilizând anticorpi marcaţi cu feritină sau fragmentele lor Fab, au arătat că GSL sunt situate pe suprafaţa externă a bistratului lipidic şi formează mari clustere (prin urmare nu sunt distribuite omogen). Aceste clustere de GSL sunt localizate independent de clusterele glicoproteinelor transmembranare (T. W. Tillack şi colab., 1983; P. Rock şi colab., 1990, 1991).

Modelele conformaţionale de energie minimă au indicat că axa catenei CHO în GSL este orientată perpendicular pe axa ceramidului, care este inserată în bistratul lipidic al membranelor plasmatice. Rezultă din aceste modele că suprafaţa externă a catenei CHO, expusă la suprafaţa celulară, constituie un domeniu hidrofob înconjurat de o zonă hidrofilă. Diferiţi liganzi cu structură complementară se pot lega la acest domeniu hidrofil expus. Astfel de liganzi sunt: anticorpii, lectinele (inclusiv selectinele), adezinele bacteriene şi moleculele CHO carbohidrat complementare (interacţii CHO-CHO specifice). Reactivitatea anticorpilor faţă de GSL, în funcţie de natura AG constitutivi, este distribuită astfel: AG cu catena scurtă < AG cu catenă lungă << 2-hidroxiAG. A fost utilizată oxidarea cu periodat a GSL pentru a evalua viteza de deplasare a acestora din reticulul endoplasmic, prin zona Golgi, spre membrane.

În cele mai multe sisteme studiate, glicolipidele au fost localizate predominant în foiţa externă a membranei plasmatice.

Experimente în care GSL neutre au fost încorporate în lipozomi multilamelari sau unilamelaţi sugerează că GSL sunt organizate ca domenii şi nu sunt dispersate uniform în bistratul de fosfolipide. Asialo-GM1 a arătat o localizare liniară în lipozomi pe bază de dimiristoil-fosfatidil-colină, sub temperatura principală de tranziţie, şi s-a organizat în mici clustere. GleCer încorporat în bistraturi de fosfatidilcolină, studiat prin calorimetrie diferenţială şi prin cinetica transferului între straturi fosfolipidice, s-a prezentat ca zone de gel distribuite într-un lichid cristalin continuu constituit din fosfatidil-colină.

S-a studiat eritrocitul de om, în care glicolipidul major este globozidul, şi eritrocitul de la ovine, în care glicolipidul principal este antigenul Forssmann. Pentru localizare au mai fost utilizate: IgG de capră anti-iepure conjugată cu feritină. Serurile anti-Forssmann şi anti-globozid

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

au fost preparate prin injectarea iepurilor cu amestecuri constând din glicolipidul respectiv şi BSA emulsionate în adjuvantul Freund; fiecare antiser obţinut este specific pentru glicolipidul imunogen respectiv. Feritina a fost conjugată la aglutinina din germeni de grâu. Conjugatul a fost purificat prin cromatografie pe coloană: s-a determinat în fiecare fracţie feritina prin absorbţie la 440 nm şi aglutinina prin aglutinarea eritrocitelor umane.

Feritina a fost conjugată cu anticorpii anti-Forssmann sau cu anti-globozid. Conjugatele au fost purificate pe coloana de Biogel iar fracţiile eluate au fost citite la 280 şi 440 nm. Conjugatele feritina-anticorp au fost determinate prin hemaglutinare. Proteina A stafilococică a fost legată la Au coloidal.

Fantomele eritrocitare au fost obţinute din celulele roşii de om şi de la ovine. Fantome eritrocitare integrale au fost preparate prin liza celulelor intacte, centrifugare, resuspendare în tampon şi incubare la 37 °C. Au fost apoi centrifugate şi resuspendate în tampon salin.

Fantome eritrocitare tripsinizate au fost obţinute prin liza celulelor roşii intacte la temperatura camerei urmat de tratamentul cu tripsină; reacţia a fost oprită cu un inhibitor al tripsinei iar fantomele eritrocitare au fost centrifugate şi resuspendate în tampon.

Fantome eritrocitare expuse la pH variabil au fost obţinute prin expunerea sedimentului, obţinut prin liză şi centrifugare, la pH 8,5 timp de 24h la 37 °C, centrifugare şi suspendare în tampon la pH 5,5.

Fantomele eritrocitare au fost tratate cu conjugate prin incubare timp de 1h la temperatura camerei. A urmat îngheţarea, fracturarea şi gravarea.

Conjugatul feritinei cu anticorpi de iepure antiglobozid nu marchează eritrocite umane intacte sau fantome eritrocitare integrale obţinute din eritrocite umane adulte. Aceasta deoarece globozidul nu este expus în eritrocitele umane adulte. Acest rezultat indică deasemenea că nu s-a realizat o marcare nespecifică a membranei eritrocitare de către conjugatele feritinei sau aurului coloidal şi nu a existat o reacţie încrucişată a anticorpilor anti-globozid cu glicoproteinele expuse ale membranei.

În contrast cu fantomele eritrocitare umane integrale, fantomele obţinute prin scurtă tripsinizare sau prin depleţia spectrinei urmată de incubare la pH 5,5 au prezentat agregare caracteristică a particulelor intramembranare pe feţele îngheţare-fracturare ale membranei şi au prezentat o marcare pronunţată de către conjugatele feritinei cu anticorpii anti-globozid. Conjugatul feritinei cu anti-globozidul era prezent pe suprafaţa membranei externe, expusă prin gravare profundă, sub formă de clustere, care se găseau în relaţie minimală cu domeniile particulelor intramembranare prezente pe feţele de fractură interne ale membranelor eritrocitare tripsinizate. Cu toate că distribuţia feritin-anti-globozidului şi a particulelor intramembranare era în ambele cazuri sub formă de clustere de mărime comparabilă, măsurători atente ale concordanţei în multe micrografe nu prezintă o corespondenţă apropiată a antiglobozidului marcat cu feritină cu domeniile particulelor intramembranare transversal pe liniile de fracturare, după cum este cea văzută cu conjugatele feritinei cu aglutinina din germeni de grâu şi alte loctine care marchează specific glicoproteinele pe eritrocite umane. Există o corespondenţă apropiată a feritin-aglutininei din germeni de grâu, care marchează sialoglicoproteinele din eritrocit uman, cu particulele intramembranare la membrana fantomelor eritrocitare normale şi tripsinizate. Chiar agregate mai mici de globozid pot fi induse, pe suprafaţa externă a fantomelor de eritrocit uman tripsinizat, printr-un procedeu de marcare dublă în care fantomele eritrocitare sunt tratate mai întâi cu anti-globozid de iepure şi apoi cu un conjugat al feritinei cu IgG de capră anti-iepure.

Pentru a demonstra în mod direct că globozidul şi glicoproteinele sunt distribuite diferit în membranele eritrocitare umane tripsinizate, au fost aplicate secvenţial două marcaje morfologic diferite pe aceleaşi fantome eritrocitare. Un conjugat al feritinei cu aglutinina din germeni de grâu (un marker pentru sialoglicolipidele componente ale membranei) a arătat o distribuţie diferită pe suprafaţa externă a membranei decât markerul pentru globozid, în acest caz antiglobozidul de

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

iepure urmat de proteina A conjugată cu aur coloidal. Feritin-aglutinina din germeni de grâu şi aurul coloidal/antiglobozid apar ca şi clustere separate pe suprafaţa externă. Prin urmare agregarea particulelor intramembranare indusă de tratamentul fantomelor eritrocitare cu tripsină sau prin depleţia spectrinei urmată de alterarea pH determină glicolipidele să se agrege pe aria dintre glicoproteine, şi nu a putut fi demonstrată nici o interrelaţie directă între receptorii CHO de pe glicolipide şi cei de pe glicoproteinele membranei.

Conceptul că GSL se găsesc predominant în foiţa externă a membranei plasmatice persistă dar alte lucrări au arătat că GSL sunt localizate deasemenea în organitele celulare. Astfel Gb4Cer este prezent în celulele rinichiului şi în granulele secretorii ale celulelor mastocite. LacCer a fost găsit intracelular în granulele secretorii ale neutrofilelor iar GalNAcIV^{3}Gb4Cer (antigenul Forssman) este prezent în organitele intracelulare ale celu-lelor MDCK din epiteliu canin. A fost demonstrată co-localizarea Gb4Cer şi a gangliozidului GM3 în filamentele intermediare ale celulelor epiteliale, gliale şi mezenchimale. Un GSL, GalCer, prezintă o localizare subcelulară variabilă în diferite celule: în membrana plasmatică a keratinocitelor HaCaT II-3, în organitele celulare ale celulelor epiteliale, în veziculele mici şi structurile tubuloveziculare ale celulelor MDCK, la suprafaţa picăturilor lipidice dense din celulele hepatoma HepG2. Totodată, în cuprinsul unui singur tip celular, GSL individuale prezintă palete diferite ale localizării subcelulare. În celulele HepG2, LacCer a fost asociat cu veziculele mici, care sunt diferite de veziculele dense ce conţineau GalCer iar Gb4Cer a fost asociat cu filamentele intermediare ale citoscheletului. GalCer şi polisialogangliozidele au fost găsite în mitocondrii. O serie de exemple ale localizării intracelulare sunt prezentate în Tabelul 39.

Tabelul 39. Localizarea subcelulară a GSL.

Glicolipid	Localizare
Gb4Cer	Filamente intermediare ale citoscheletului celular Vezicule citoplasmice Membrana plasmatică
GT3, O-Ac-GT3, polisialogangliozide	Structuri tubuloveziculare (altele decât filamentele intermediare)
GalCer	Structuri tubuloveziculare Membrana plasmatică Vezicule intracelulare
GM1	Vezicule intracelulare (altele decât cele ale GalCer)
GM2 GM1 GM3	Vezicule citoplasmice mici Vezicule perinucleare Plăci adezive de la baza celulelor

2.7.PROTEINE ACTIVATOARE ŞI TOPOLOGIA CATABOLISMULUI GLICOSFINGOLIPIDELOR

Degradarea lizozomală a multor sfingolipide de către hidrolazele acide este dependentă de cofactori neenzimatici cu molecule relativ mici, numiţi proteine activatoare de sfingolipide,

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

unele dintre acestea fiind identificate ca proteine care leagă sfingolipidele. Există actualmente o cantitate apreciabilă de informaţie asupra structurii, funcţiei, biosintezei, organizării genice şi patobiochimiei proteinelor activatoare de sfingolipide (*sap*) cunoscute. Au fost elaborate deasemenea modele asupra modului lor de acţiune şi asupra topologiei degradării lizozomale a glicolipidelor.

Prima *sap* a fost descoperită în anul 1964 (E. Mehl şi H. Jatzkewitz), proteina activatoare a sulfatidului, numită şi *sap*-B (alte denumiri sunt în Tabelul 40). Cu toate că ulterior au fost descoperite multe *sap*, identitatea lor, specificitatea şi funcţia sunt adesea neclare. Când datele asupra secvenţei au devenit disponibinile, a rezultat că numai două gene codifică 5 *sap* reale sau prezumtive. O genă conţine informaţia genetică pentru proteina activatoare a gangliozidului GM2 (activatorul GM2) iar cealaltă pentru prosaposină sau precursorul *sap* care este transformat în patru proteine omoloage, aşa-numitele saposine A, B, C, D (J. S. O'Brien şi colab., 1988) sau *sap* A-*sap* D, inclusiv proteina activatoare a sulfatidului (*sap*-B) şi proteina activatoare a glucozilceramidazei (*sap*-C) (Tabelul 40).

2.7.1. Activatorul GM2

ß-Hexozaminidaza A umană hidrolizează resturile ß-GalNAc terminale din sfingolipide ca: gangliozidul GM2, derivatul său asialo (GA2) şi globozidul (E. Conzelmann şi K. Sandhoff, 1979). *In vitro*, proteina-activator GM2 stimulează degradarea GM2, GA2 şi, într-o măsură redusă, degradarea globozidului de către această enzimă. In vivo activatorul pare esenţial numai pentru hidroliza GM2 şi GA2 de către heterodimerul hexozaminidazei A (αß). ß-Hexozaminidaza B umană (ßß) nu joacă nici un rol în catabolismul GM2 şi GA2 deoarece ea acţionează pe aceste substrate numai in vitro în prezenta detergenţilor dar nu în prezenţa proteinelor.

Tabelul 40. Nomenclatura şi unele proprietăţi fizico-chimice ale proteinelor activatoare de sfingolipide şi glicosfingolipide.

Gena	Produşii genetici	Alte denumiri	Resturi deAA/ monomer	Carbo-hidrat/ monomer	Trans-fer lipidic
gena GM2-activatorului	GM2-activator	SAP-3	162	1	da
Gena sap-precursorului (prosaposina)	sap-precursor	prosaposina	524	5	?
	sap-A	saposina A	84	2	?
	sap-B	saposina B	80	1	da
		SAP-1			
		proteina A2-activator			
		activatorul cerebrozid sulfatazei			
		activatorul sulfatidului			
		GM1-activatorului			
		activator nespecific			
	sap-C	saposina			
		SAP-2			
		proteina A1-activator			
		proteina activator a			

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

	GlcCer			
	proteina activator			
	Gaucher			
	co-ß-glucozidaza			
	factor termostabil			
	factor P			
	proteina A sfingolipid activatoare			
sap-D	saposina D	78	1	?

activatoare. Mutaţii moştenite ale catenei α determină o depozitare patologică a gangliozidului în maladia Tay-Sachs (varianta B de gangliozidoză GM2), mutaţii în catena ß au ca rezultat deficienţe ale ambelor hexozaminidaze, A (αß) şi B (ßß), şi determină depozitarea gangliozidului GM2, globozidului şi altor lipide în maladia Sandhoff (varinta 0 de gangliozidoză GM2). Semnificaţia fiziologică a GM2-activatorului a devenit clară în momentul când varianta rară AB de GM2-gangliozidoză a putut fi atribuită deficienţei GM2-activatorului (E. Conzelmann şi K. Sandhoff, 1978) şi nu deficienţei hexozaminidazelor A sau B. În ciuda prezenţei hexozaminidazelor A şi B active în ţesuturile acestor pacienţi, clivarea gangliozidului GM2 şi a glicolipidului GA2, dar nu a globozidului, este blocată, ceea ce duce la o acumulare letală a acestor glicolipide (15% şi, respectiv, 2,8% din greutatea uscată a ţesutului cerebral (K. Sandhoff şi colab., 1971)). Deficienţa GM2-activatorului în fibroblaşti de cultură şi în eşantioane de creier provenite de la pacienţii cu varianta AB a fost demonstrată prin metode enzimatice şi imunochimice (A. Banerjee şi colab., 1984). Când GM2-activatorul a fost adăugat la fibroblaşti din piele, în cultură, proveniţi de la un astfel de pacient, acesta a fost preluat de celule şi catabolismul gangliozidului GM2 a fost normalizat (S. Sonderfeld şi colab., 1985).

Proprietăţi fizico-chimice. Proteina GM2-activatoare constă dintr-o catenă polipeptidică de 162 aminoacizi care conţine o catenă carbohidrat N-linkată pe Asn32 (W. Furst şi colab., 1990) care este de tip complex cu un înalt conţinut de manoză. Masa moleculară obţinută prin gel-filtrare (23,5-25 kDa) (S. -C. Li şi colab., 1981) este în acord cu valoarea găsită prin denaturare SDS-gel electroforeză şi cu cea calculată pentru catena polipeptidică lipsită de carbohidraţi (17,6 kDa), indicând o structură monomeră a proteinei. Punctul izoelectric de 4,8 este datorat predominanţei aminoacizilor acizi. Cele opt resturi de Cys formează probabil punţi disulfurice, ceea ce ar putea contribui la stabilitatea neobişnuit de mare, atât termică (până la 60°C) cât şi faţă de proteinaze cum ar fi tripsina şi chimotripsina.

Mecanismul de acţiune. GM2-activatorul stimulează numai hidroliza GM2 şi GA2, de către hexozaminidaza A, dar nu a substratelor sintetice acvosolubile (ca de ex. 4-MU-2-acetamido-2-deoxi-ß-D-glucopiranozidul sau derivatul său 6-sulfo). Pentru a înţelege modul său de acţiune au fost analizate interacţiile dintre GM2-activator şi substrat şi dintre complexul activator/substrat şi hexozaminidaza A. Formarea complexului acvosolubil, stabil, în raportul 1:1 între GM2-activator şi gangliozidul GM2, a fost demonstrată prin gel-filtrare, electroforeză, focusare izoelectrică şi studii de ultracentrifugare. Din aceste experimente şi din observaţia că GM2-activatorul se leagă puternic la octil-sefaroză, s-a dedus că această proteină conţine un situs de legare hidrofob. Acest situs este marcat cu Br-acetil-lizo-GM2, care se leagă selectiv la GM2-activator şi îl inactivează prin reacţie covalentă cu un nucleofil (S. Neunhofer şi K. Sandhoff, 1985). Numai moleculele glicolipidice din foiţa externă a membranei sunt accesibile GM2-activatorului, indicând că acesta

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

nu poate penetra membrana. Din secvența de aminoacizi a GM2-activatorului au fost prezise trei α-spirale amfifile, care ar putea contribui la existența cavității hidrofobe. Totuși, specificitatea GM2-activatorului este determinată de situsul său de legare a carbohidraților. Din experimente cinetice au fost determinate constantele de disociere a complexelor activatorului cu GM2 și GA2: 3,5μM și respectiv 450 μM. Aceste rezultate sugerează o importantă contribuție a sarcinii negative a acidului sialic, la legarea GM2. Derivații GM2 în care gruparea carboxil a AS este metilată sau redusă la o grupare alcool nu pot fi degradați de către hexozaminidaza A în prezența GM2-activatorului dar sunt hidrolizate în prezența detergenților (S. Handa și K. Nakamura, 1984). GM2-activatorul este capabil să transfere sfingolipidele din lipozomi donori în lipozomi acceptori, iar pentru o viteză înaltă de transfer este necesară prezența resturilor de AS și de GalNAc (GM1 > GM2 >> GD1a >> GM3 = GA2) (Tabelul 41). În acord cu calculele privind conformația porțiunii de acid sialic din GM2 s-a arătat că aceasta este situată departe de ancora ceramidică hidrofobă care se leagă la situsul hidrofob al proteinei activatoare (C.H. Wynn și B. Robson, 1986).

Tabelul 41. Acțiunea GM2-activatorului și a *sap*-B ca proteine de transfer a glicosfingolipidelor.

GSL transferat	Viteza de transfer (nmoli/h/nmol proteină activatoare)	
	GM2-activator	sap B
GalNAc-GD1a	350	n.d.*
GM2	1040	n.d.
GD1a	220	9,6
GM1	660	4,5
GM2	470	3,0
GM3	80	0,4
GA2	65	n.d.
Sulfatid	n.d.	1,0
GalCer	n.d.	0,5
GlcCer	n.d.	< 0,1

* n.d., nedeterminat

În prezența detergenților adecvați atât hexozaminidaza A (αß) cât și hexozaminidaza B (ßß) hidrolizează GM2 și GA2. Dar hidroliza acestor glicolipide, stimulată de activator, se limitează la hexozaminidaza A. La rândul ei, proteina activator stimulează exclusiv hidroliza de către hexozaminidaza A (αß) a acestor glicolipide. Acest rezultat a fost atribuit unei interacții specifice între complexul activatorului cu glicolipidul și enzimă (H. J. Kytzia și K. Sandhoff, 1985). Complexul GM2-activatorului și gangliozidului GM2 precum și substratele sintetice încărcate negativ, ca de ex. 4-MU-2-acetamido-2-deoxi-6-sulfo-ß-D-glucopiranozid, sunt hidrolizate de către hexozaminidazele A și S (αα) și competiționează pentru situsul activ de pe catena α a enzimelor. Deoarece GM2-activatorul inhibă degradarea acestui substrat sintetic de către ambele enzime, chiar în absența GM2, subunitatea α (și prin urmare hexozaminidazele A și S, dar nu hexozaminidaza B) posedă un situs de legare al activatorului. O interacție specifică între GM2-activator și hexozaminidaza A ar putea fi necesară pentru poziționarea corectă a gangliozidului GM2 în situsul activ al enzimei. *Sap*-B poate deasemenea lega gangliozidul GM2 și poate accelera hidroliza acestuia de către sialidaza bacteriană in vitro (S. C. Li și colab., 1988)

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

dar nu stimulează hidroliza GM2 de către hexozaminidaza A. Din aceste date a fost propus un model pentru modul de acţiune al GM2-activatorului. Mai întîi activatorul extrage o singură molecula de GM2 din membrană (sau din micelă) şi formează un complex 1:1, acvosolubil, cu gangliozidul (modalitatea unu). Hexozaminidaza A leagă acest complex, hidrolizează molecula GM2 la GM3 şi eliberează complexul activatorului cu glicolipidul. Este desemenea posibil ca formarea complexului glicolipidului cu proteina activatoare şi enzima să aibă loc pe suprafaţa membranei, şi nu liber în soluţie (modalitatea doi). Gangliozidul GalNAc-GD1a are aceeaşi structură terminală ca gangliozidul GM2 dar legătura este susceptibilă la hexozaminidaza A deoarece legătura este plasată la distanţă mai mare faţă de suprafaţa membranei (6,5-7,6 Å) decât cazul gangliozidului GM2 (2,2 Å) (E. M. Meier şi colab., 1991). Dacă GalNAc-GD1a este încorporat în membrane lipozomale, acesta este hidrolizat de către hexozaminidaza A fără contribuţia proteinei activatoare. Hexozaminidaza A, asemănător unei lame de ras sau unui foarfece de iarbă, recunoaşte şi clivează toate substratele de pe suprafaţa membranei (de ex. GalNAc-GD1a) care proemineză la o distanţă suficient de mare în spaţiul apos. Totuşi, acele substrate glicolipidice care au fragmentul oligozaharidic prea scurt pentru a fi atins de către enzima acvosolubilă, nu pot fi hidrolizate. Hidroliza acestora necesită GM2-activatorul care complexează substratul (de ex. gangliozidul GM2) îl înalţă câţiva Å de la membrană şi permite enzimei să hidrolizeze substratul (modalitatea doi). Nu se ştie dacă GM2-activatorul, in vivo, acţionează conform cu modalitatea 1 sau cu modalitatea 2 sau cu ambele.

În afară de gangliozidul GM2, GM2-activatorul stimulează hidroliza de către hexozaminidaza A a glicolipidului GA2 şi al unui analog al gangliozidului GM2 care poartă o grupare sulfat în locul restului de acid sialic (I. Ishizuka şi colab., 1985). Degradarea unor glicolipide ca de ex. globozidul şi GalNAc-GM1a (T. Itoh şi colab., 1981) de către hexoza-minidaza A este stimulată într-o măsură redusă.

Proteine similare GM2-activatorului uman au fost găsite la şobolan, şoarece, bovine, suine, cobai şi la chefal (*Mugil cephalus*). Acestea stimulează hidroliza GM2 de către hexozaminidazele acestor specii. Cel puţin proteinele de la primele patru specii realizează transferul GM2 de la lipozomi donori la lipozomi acceptori. Dar toate aceste proteine stimulează hidroliza GM2 de către hexozaminidaza A umană într-o anumită măsură. Deşi aceste proteine nu reacţionează cu un antiser anti-proteină activator umană, pare probabilă o înrudire cu proteina activator umană şi cu modul de acţiune al acesteia.

Biosinteza. Gena GM2-activatorului a fost cartată pe cromozomul uman 5 utilizând testul ELISA pentru a identifica proteina umană în celulele hibrid somatice om-şoarece. Alţi autori au contestat acest rezultat. Ei nu au putut genera produşi prin amplificare PCR pe cromozomul 5 prin utilizarea primerilor pe baza secvenţei cDNA al GM2-activatorului. Autorii respectivi nu au obţinut informaţii despre localizarea genei deoarece primerii utilizaţi sunt separaţi în gena funcţională printr-un intron vast de mai mult de 6 kb. Gena acoperă o regiune de cel puţin 15 kb. Regiunea care codifică proteina este întreruptă de trei introni. cDNA codifică o preproteină de 193 aminoacizi (H. Klima şi colab., 1991). Peptidul semnal de intrare (23 aminoacizi) şi proteina matură (162 aminoacizi) sunt legate prin intermediul unui propeptid de 8 aminoacizi care este îndepărtat în timpul prelucrării. Studii asupra prelucrării GM2-activatorului în fibroblaşti din piele de provenienţă umană au relevat deasemenea prezenţa unui precursor de 24 kDa (J. Burg şi colab., 1985). În celule a fost detectată numai forma matură de 21-22,5 kDa, ceea ce sugerează o prelucrare rapidă, în comparaţie cu viteza scăzută de biosinteză. GM2-Activatorul a fost localizat în lizozomi. Asemeni majorităţii proteinelor lizozomale, el poate atinge acest organit prin intermediul căii manoză-6-fosfat (S. Kornfeld, 1989). Acest mecanism este în mare măsura blocat în cazul maladici celulare mucolipidoza II, când formarea semnalului manoză-6-fosfat este redusă din cauza unui defect pe fosfotransferază. În catena carbohidrat N-linkată a GM2-activatorului au

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

fost detectate resturi terminale de manoză precum şi gruparea fosfat. Secreţia de precursor, atât în cazul fibroblaştilor normali cât şi a celor cu maladia celulară I, este stimulată prin adăugare de clorură de amoniu la mediul de cultură. Un nivel ridicat a fost găsit deasemenea în serul pacienţilor cu maladia celulară I. Ca şi in cazul altor proteine lizozomale (L. E. Quintern şi colab., 1989) au fost găsite cantităţi apreciabile de GM2-activator în serul uman (48 ng/ml) şi urină (600 ng/mg proteină). Totuşi, nu se ştie care celule secretă proteina activatoare şi dacă aceasta are vreo funcţie înafara celulei. Concentraţia sa în ficat, splină, creier şi placentă, toate de provenienţă umană, se situează în domeniul 50-120 ng/mg proteină. Valorile extrem de ridicate găsite în rinichi (800 ng/mg proteină) ar putea fi datorate biosintezei crescute şi/sau recaptării sale din urină primară.

Până în prezent nu sunt disponibile informaţii despre reglarea posibilă a biosintezei GM2-activatorului. Totuşi, s-a găsit că în ţesuturile de la pacienţii cu gangliozidoză GM2 tip B (maladia Tay-Sachs) şi de tip O (maladia Sandhoff) nivelul GM2-activatorului este ridicat printr-un factor de 2-10. În mod similar au fost găsite cantităţi crescute de *Sap*-C în splina Gaucher (S. S. Iyer şi colab., 1983). Aceasta ar putea fi datorată fenomenelor de reglare sau depunerii activatorilor împreună cu glicolipidele depozitate în lizozomi.

Disponibilitatea cDNA corespunzător GM2-activatorului a dus la prima identificare a unei mutaţii care determină deficienţa GM2-activatorului (varianta AB) (M. Schroeder şi colab., 1991). O singură interschimbare a bazei azotate a condus la substituţia Cys-107, din proteina normală matură, cu Arg şi prin aceasta a suprimat probabil formarea punţii disulfurice care este importantă pentru structura şi stabilitatea proteinei activatoare. Printr-o altă mutaţie, Arg-169 normală a fost substituită cu Pro. cDNA a GM2-activatorului a permis deasemenea expresia şi purificarea proteinei neglicozilate din celule procariote şi renaturarea sa ca proteină funcţională.

2.7.2. Proteine derivate din *sap*-precursor

Structura sap-precursorului (prosaposinei). Activatorul sulfatidului (*sap*-B sau SAP-1), activatorul glucozil-ceramidazei (*sap*-C sau SAP-2) şi două alte proteine potenţial activatoare (*sap*-A şi D) sunt derivate dintr-un precursor comun (T. Nakano şi colab., 1989). cDNA a *sap*-precursorului codifică o catenă polipeptidică de 524 AA care conţine patru domenii omoloage din aproximativ 80 AA fiecare. Aceste domenii corespund *sap*-A mature (saposina A) (S. Morimoto şi colab., 1989), *sap*-B (saposinei B) mature (T. K. Kleinschmidt şi colab., 1988), *sap*-C (saposinei C sau SAP-2) mature (T. K. Kleinschmidt şi colab., 1987), *sap*-D (saposinei D sau componentei C) mature (W. Furst şi colab., 1988), izolate din ţesuturi umane. Gradul de identitate a fiecărei perechi din aceste proteine se situează în domeniul 23-39%, 15 AA fiind păstraţi în toate patru proteinele, printre aceştia şase resturi de cisteină şi un semnal al N-glicozilării.

Sap-B (activatorul sulfatidului sau SAP-1). Sap-B a fost prima proteină activatoare de sfin-golipide descrisă. S-a observat că arilsulfataza A, purificată din rinichi de suine, nu hidrolizează substratul natural, sulfatidul, în absenţa detergenţilor. Această capacitate a putut fi restabilită prin adăugarea unei alte fracţii, ultima fiind enzimatic inactivă. O proteină cu proprietăţi similare a fost purificată din ficat uman (H. Jatzkewitz şi K. Stinshoff, 1973). În vitro ea stimulează hidroliza sulfatidului, seminolipidului (un sulfoglicerolipid) şi, într-o măsură redusă, formele lor deacilate: psihozin-sulfatul şi lizoseminolipidul (G. Fischer şi colab., 1978). Mai târziu au fost descrise proteine activatoare pentru hidroliza gangliozidului GM1 de către ß-galactozidaza din ficat uman (S. C. Li şi Y. T. Li, 1976) şi a globotriaozil-ceramidului de către α-galactozidaza A (S. Gartner şi colab., 1983). Prin studii enzimatice şi imunochimice s-a arătat că aceste proteine activatoare sunt identice cu *sap*-B (M. N. Banks şi colab., 1987) dar în mod evident diferite de GM2-activator (S. C. Li şi colab., 1979). Degradarea Edmann a proteinei activatoare A2, unul dintre factorii de stimulare a sfingomielinazei, a arătat că aceasta este

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

deasemenea identică cu *sap*-B (H. Khristomanou şi colab., 1986). În afară de sulfatide, gangliozidul GM1, Gb3Cer şi sfingomielină, *sap*-B leagă fosfatidilserina şi galactozil-ceramidul, gangliozidele GM2 şi GM3 şi glicolipidul GA1. *In vitro*, *sap*-B stimulează hidroliza gangliozidului GM1 şi glicolipidului GA1 de către ß-galactozidază şi a gangliozidelor GD1a, GT1b şi GD3 de către sialidaza lizozomală. Li şi colab., (1988) au arătat că *sap*-B stimulează hidroliza a aproximativ 20 de glicolipide natu-rale sau modificate chimic, printre acestea şi gliceroli-pidele, de către şase enzime cu origine umană, vegetală şi bacteriană. Pe de altă parte clivarea lizozomală a gangliozidului GM1 de către ß-galactozidază pare a fi independentă de proteinele activatoare, probabil din cauza că restul de Gal terminală este astfel expus încât permite clivarea directă de către ß-galactozi-daza cu o viteza suficient de ridicată.

Specificitatea scăzută a *sap*-B faţă de lipide şi enzime ridică problema funcţiei sale fiziologice. Defectele genetice ale lui *sap*-B duc la diferite forme de leucodistrofie meta-cromatică cu izbucniri juvenile sau infantile dar având nivelul arilsulfatazei A aproape normal. În plus faţă de sulfatid, cantităţi crescute de Gb3Cer şi digalactozil-ceramid sunt excretate în urina pacienţilor respectivi (S. C. Li şi colab., 1985). O biopsie rectală a arătat neuroni non-metacromatici, dar colorabili prin reacţia acid periodic-Schiff, neuronii submucoasei fiind totodată plini cu corpi citoplasmatici membranoşi precum şi depozit prezentând colorare metacromatică în macrofage. Degradarea sulfatidului şi Gb3Cer, adăugate exogen la fibroblaşti de cultură din piele este aproape total blocată, dar poate fi parţial restabilită, prin adăugare de *sap*-B în mediul de cultură (R. L. Stevens şi colab., 1981). Adăugarea la aceste celule de gangliozid GD1a a dus la nivele crescute de GM3 şi, într-o măsură redusă, de LacCer dar nu GM1. Aceste rezultate subliniază rolul *sap*-B în degradarea sulfatidului de către arilsulfataza A, a Gb3Cer şi digalactozilceramidului de către α-galactozidaza A şi chiar a lui GM3 de către sialidaza acidă.

Proprietăţi fizico-chimice. Degradarea Edman a *sap*-B a indicat o catenă polipeptidică de 80 AA care conţine o catenă carbohidrat de tip complex pe Asn 21 (K. Yamashita şi colab., 1990), MM găsită prin gel-filtrare (20-22 kDa) este aproximativ dublul valorii calculate din secvenţa (8973 Da, fără carbohidrat) şi obţinută prin SDS-PAGE sugerând o structură homodimer (S. Fujibayashi şi D. A. Wenger, 1986). Formele de 13 kDa găsite în gangliozidoza GM1 pot fi datorate unei prelucrări perturbate a catenei carbohidrat din cauza unei ß-galactozidaze acide defecte. Punctul izoelectric al *sap*-B este la pH 4,1-4,3. Analiza secvenţei a sugerat trei spirale amfifile pentru fiecare subunitate, care este extrem de probabil că constituie situsul de legare a glicolipidelor hidrofobe de către *sap*-B. Cele şase resturi de Cys a fiecărei catene polipeptidice stabilizează probabil dimerul prin formarea unor punţi disulfurice intra- şi intermoleculare. Aceste legături reticulate şi plierea compactă a proteinei pot constitui explicaţia stabilităţii neobişnuit de ridicate faţă de pH extreme (pH 1,4-12), încălzire (până la 95 °C) şi proteinaze (tripsină şi chimotripsină).

Mecanismul de acţiune. Modul de acţiune propus pentru *sap*-B de către Fischer şi Jatzkewitz (1978) se aseamănă în multe privinţe cu cel al GM2-activatorului. *Sap*-B extrage o singură moleculă de sulfatid din micele sau membrane şi îl leagă sub forma unui complex acvo-solubil 1:1 (G. Fischer şi H. Jatzkewitz, 1977). Un astfel de complex (fie liber în soluţie, fie ataşat încă la bistratul lipidic) reprezintă adevăratul substrat al reacţiei enzimatice. Arilsulfataza A clivează gruparea sulfat de pe molecula substrat legată pe activator, după care produşii sunt eliberaţi de la proteine.

În contrast cu GM2-activatorul, *sap*-B are o largă specificitate faţă de glicolipide. De aceea Wynn (1986) a propus modelul domeniului cu legare triplă pentru interacţia lipidelor cu *sap*-B. El a sugerat că fragmentul ceramidic hidrofob se leagă la domeniul hidrofob al lui *sap*-B care ar putea fi constituit din şase spirale amfifile (câte trei pentru fiecare subunitate de *sap*-B), ca în albumina serică. Sarcina negativă a grupării sulfat (din sulfatid) sau a resturilor de acid sialic

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

(din GM1) ar putea interacționa cu o grupare încărcată pozitiv pe sap-B, iar grupările hidroxil ale porțiunii carbohidrat din glicolipide ar forma legături de hidrogen cu o structură complementară de pe proteina activatoare. Glicolipidul se leagă numai dacă sunt posibile cel puțin două astfel de interacții.

Datele experimentale sprijină în mare măsură acest model. Astfel, restul acil din fragmentul hidrofob cât și natura catenei carbohidrat sunt importante pentru recunoașterea glicolipidului de către *sap*-B. *Sap*-B stimulează numai hidroliza derivaților sulfatidului și derivaților GM1 cu catene acil de cel puțin șase și respectiv opt atomi de carbon (Tabelul 42). Glicolipidele având mai puțin de trei hexoze sunt transferate de la lipozomii donori la lipozomii acceptori cu o viteză foarte

Tabelul 42.Efectul *sap*-B asupra degradării unor derivați ai sulfatidului (de către arilsulfatază) și a gangliozidului GM1 (de către ß-galactozidază).

GSL	Viteza de degradare (nmoli/h/mU enzimă)	
	fără *sap*-B	cu *sap*-B
C_{18}-sulfatid	0,03	0,38
C_6-sulfatid	0,05	0,18
C_2-sulfatid	0,13	0,14
Lizo-sulfatid	0,58	0,57
C_{18}-GM1	0,02	0,18
C_8-GM1	0,40	0,52
C_2-GM1	0,85	0,90
Lizo-GM1	1,29	1,28
GM1 din creier bovin	0,02	0,18
GM1 alcool	0,02	0,18
GA1	0,03	0,06
LacCer	0,02	0,02

scăzută în comparație cu lipidele complexe (Tabelul 42). Pe de altă parte nu este esențială sarcina negativă a glicolipidului deoarece metilarea grupării carboxil a acidului sialic din GM1 sau reducerea ei la o grupare hidroxil nu are nici un efect asupra vitezei de hidroliză a glicoli-pidului. În mod similar gruparea sulfat din sulfatid nu este esențială pentru legarea *sap*-B.

Sap-B stimulează hidroliza multor glicolipide de către multe enzime de proveniență umană, vegetală sau chiar bacteriană. Enzimele recunosc probabil numai substratul legat la *sap*-B dar nu recunosc pe *sap*-B ca atare. În felul acesta, spre deosebire de GM2-activator, *sap*-B pare a acționa ca un detergent fiziologic cu specificitate largă pentru a solubiliza substratele glicolipidice.

Maladia Tay-Sachs, o maladie lizozomală moștenită care duce la acumularea gangliozidului GM2 în creier, este cauzată de o dificiență a ß-hexozaminidazei A sau activatorului lui GM2. Burg și colab., (1983) au găsit că din cele două izoenzime lizozomale ale hexozaminidazei umane, numai ß-hexozaminidaza A, dar nu B, clivează GM2 în prezența activatorului lui GM2. Aceiași autori au găsit că la șoarece ß-hexozaminidaza B este mai activă decât ß-hexozaminidaza A în clivarea lui GM2. Alte două studii, realizate în mod independent pe șoareci cu disfuncții ale genei ß-hexozaminidazei nu prezintă o acumulare severă de GM2 în

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

creier sau manifestări comportamentale anormale concomitente similare cu cele văzute la pacienţi umani cu maladia Tay-Sachs. S-a sugerat că rezultatele celor două studii pot fi atribuite activităţii degradative a lui GM2 de către ß-hexozaminidaza B de la şoarece. Purificarea celor două enzime A şi B din ficat de şoarece şi prepararea activatorului recombinant a lui GM2 de la acelaşi rganism a dus la clarificarea specificităţii celor două enzime şi la o mai bună înţelegere a rezultatelor obţinute prin utilizarea şoarecelui ca model experimental pentru maladia Tay-Sachs. Contrar grupului lui Burg, s-a găsit că specificitatea enzimelor A şi B de la şoarece în catabolismul lui GM2 nu sunt diferite de izoenzimele umane corespunzătoare. Astfel, ß-hexozaminidaza A de la şoarece hidrolizează GM2 în prezenţa activatorului lui GM2, în timp ce ß-hexozaminidaza B nu hidrolizează gangliozidul GM2 nici în prezenţa nici în absenţa activatorului lui GM2. Un fapt suplimentar important este că activatorul GM2 de şoarece, spre deosebire de cel uman, prezintă o stimulare eficientă a hidrolizei lui GA2 de către ß-hexozaminidaza A de şoarece şi, într-o măsură mai mică, deasemenea de către ß-hexozaminidaza B. Aceste rezultate dovedesc existenţa unei căi alternative pentru catabolizarea lui GM2 la şoarece prin transformarea lui GM2 la GA2 şi ulterior la LacCer. Totodată, aceste rezultate explică lipsa acumulării excesive a lui GM2 la şoarecii cu disfuncţionalităţi ale genei ß-hexozaminidazei (J. A. Yuziuk şi colab., 1998).

În studiul interacţiei dintre ß-hexozaminidaza A (sau sialidază), gangliozidul GM2 şi proteina GM2-activatoare, a fost sintetizat un analog al gangliozidului GM2, numit 6'GM2 şi având următoarea structură: GalNAcß1-6(Neu5Acα2-3)Galß1-4Glcß1-1'Cer (H. Ishida şi colab., 1997). S-a pornit de la faptul că GalNAc şi Neu5Ac, din molecula GM2, nu sunt hidrolizate de către ß-hexozaminidaza A şi, respectiv, sialidază, în absenţa proteinei activatoare. A fost studiată susceptibilitatea enzimatică a gangliozidelor GM2 şi 6'GM2 precum şi a oligozaharidelor derivate din GM2, asialo-GM2 şi 6'GM2. Totodată au fost analizate proprietăţile conformaţionale ale GM2 şi 6'GM2 prin spectroscopia RMN şi calcule de mecanică moleculară. În mod surprinzător, fragmentele GalNAc şi Neu5Ac din 6'GM2 au fost hidrolizate de către ß-hexozaminidaza A şi, respectiv, sialidază, în absenţa proteinei GM2-activatoare. În privinţa oligozaharidelor, numai oligozaharidul lui GM2 a fost rezistent la ß-hexozaminidaza A. Analiza conformaţională a arătat că, în timp ce gangliozidul GM2 posedă un fragment oligozaharidic compact şi rigid, 6'GM2 posedă un aranjament spaţial deschis al unităţilor glucidice astfel că GalNAc şi Neu5Ac sunt liber accesibile interacţiilor externe. Rezultatele de mai sus arată că rezistenţa lui GM2 la hidroliza enzimatică se datorează conformaţiei rigide a oligozaharidului lui GM2 (Y. T. Li şi colab., 1999).

3. Distribuţia glicolipidelor în lumea vie

Există două mari clase de glicolipide, în funcţie de fragmentul hidrofob:
- glicoglicerolipide
- glicosfingolipide

3.1. Glicoglicerolipide.

Prezenţa în creier a glicerolipidelor care conţin galactoză a fost relatată de către mai multe grupuri (Stein şi Benson, 1963; Norton şi Brotz, 1963; Rouser şi colab., 1967). Patru glicolipide minore au fost purificate din extractul lipidic din substanţa albă din creier bovin (Norton şi Brotz, 1963); una dintre componente, reprezentând cam 0,2% din totalul substanţei albe, s-a găsit a fi un amestec de diacil-gliceril-galactozid şi un monoalchil-mono-acil-gliceril-galactozid. Structurile

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

acestor compuşi au fost ulterior caracterizate ca 1,2-di-O-acil-3-O-(ß-D-galactopiranozil)-sn-glicerol (monogalactozil-diglicerid; Galp(ß1-3)-sn-R_2-glicerol) şi 1-O-alchil-2-O-acil-3-O-(ß-D-galactopiranozil)-sn-glicerol (Rumsby, 1967; Rumsby şi Rossiter, 1968; Norton şi Brotz, 1963). Constituentul alkil-eter este în mod predominant un rest hexadecil, în lipidul din substanţa albă studiată de către aceste grupuri. Forma alkil-eter a acestui galacto-glicerolipid a fost deasemenea găsită printre glicolipidele din creier bovin, porcin şi ovin (Rumsby, 1967; Rumsby şi Rossiter, 1968) în cantităţi situate între 0,01 şi 0,04 µmoli per g ţesut umed; nu a fost detectat în fracţia monogalactozil-di-glicerid a creierului de şobolan (Wells şi Dittmer, 1966). Structura monogalactozil-digliceridului este identică cu cea din plante (Carter şi colab., 1961) dar compoziţia în AG este diferită.

O particularitate a peştilor gadoizi este că sistemul nervos al acestora conţine galactozil-diacil-glicerol şi esterul sulfat al acestuia (Y. Tamai şi colab., 1993).

Buretele senegalez *Trikentrion loeve* Carter conţine un glicoglicerolipid la care grupările hidroxil din poziţiile 2 şi 3 ale glicerolului sunt legate prin legături ß-glicozidice la două molecule de xiloză; structura este următoarea: 1-O-(Z-tetracos-17-enil)-2,3-di-O-(ß-D-xilopiranozil)-sn-glicerol (V. Constantino şi colab., 1993).

Din seminţe de fasole Adzuki (*Vigna angularis*) au fost izolate şi caracterizate patru glicoglicerolipide cu următoarea structură: Galß1-3'- , Galα1-6Galß1-3'-, Galß1-6Galß1-3'-, $[Galß1-6]_2$-Galß1-3'-, Galß1-6Galα1-6Galß1-3'-, $[Galß1-6]_3$-Galß1-3'- şi $[Galß1-6]_2$-Galα1-6Galß1-3'-DAG (M. Kojima şi colab , 1990). Distribuţia Galß1-6Galß1-3'-DAG în frunzele unor plante, ferigi, muşchi şi alge este prezentată în Tabelul 43 iar proporţia relativă a aceluiaşi compus în anumite organe ale plantelor superioare este prezentată în Tabelul 44.

Tabelul 43.Distribuţia izomerului DGDG-B în frunzele unor plante, ferigi, muşchi şi alge

Specie	% izomer B* din total
Angiosperme	
Oryza sativa	1-7
Triticum aestivum	2
Convallaria majalis	3
Ipomoea batatas	2
Tirfolium repens	1
Raphanus sativus	<1
Zea mays, Spinacia oleracea, Lactuca sativa, Allium tuberosum, Allium fistulosum, Cryptotaenia canadensis, Brassica campestris, Brassica rapa, Brassica pekinensis, Brassica oleracea, Petasites japonicus,Oenanthe stolonifera, Perilla frutescens,, Chrysanthemum coronarium, Angelica keiskei, Vitis vinifera	n. d.†
Gymnosperme	
Taxus cuspidata	<1
Pinus nigra	8
Pinus mugo	5
Abies sachalinensis	5
Thuja occidentalis	4
Juniperus chinensis	1
Larix kaempferi, Ginkgo biloba	n. d.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Pteridofite	
Equisetum arvense	6
Matteucia struthioptens	2
Athyrium brevifrons, Woodsia polystichoides, Phegopteris polypodioides, Osmunda japonica, Osmundastrum cinnamomeum	n. d.
Briofite	
Hedwigia ciliata	10
Dicranum scoparium	10
Leucobryum bowringii	9
Alge	
Ulva pertusa	1
Monostroma zostericola	2
Rhodoglossum pulcherum, Tichocarpus crinitus, Costaria costata	n. d.

* Procentajul de Galß1-6Galß1-3'DAG (izomerul B) din DGDG total.
† n. d., nu s-a găsit deloc izomerul B

Tabelul 44. Proporţia relativă de izomer B în DGDG din anumite organe ale plantelor superioare.

Plantă	% izomer B*
Seminţe mature	
Soia, *Glycine max* (4)†	7,0-13,0
Fasole Adzuki, *Vigna angularis* (5)	26,4-32,5
Fasole, *Phaseolus vulgaris* (4)	18,3-21,3
Fasole cătărătoare, *Phaseolus coccineus* (2)	12,9-15,2
Fasole cu bob larg, *Vicia faba* (1)	13,3
Mazăre, *pisum sativum* (1)	1,9
Porumb, *Zea mays* (1)	2,6
Grâu, *Triticum aestivum* (5)	< 0,1
Secară, *Secale cereale* (1)	< 0,1
Orez, *Oryza sativa* (1)	< 0,1
Seminţe imature	
Soia, *Glycine max* (30-70 ZDI)‡ (4)	1,3-7,2
Fasole Adzuki, *Vigna angularis* (25-55ZDI)‡ (13)	1,9-18,1
Cotiledon	
Fasole Adzuki, *Vigna angularis* (5 ZDG)§ (1)	28,0
Hipocotil	
Soia, *Glycine max* (5 ZDG) (2)	1,8-2,9
Fasole Adzuki, *Vigna angularis* (5 ZDG) (1)	2,5
Fasole, *Phaseolus vulgaris* (5 ZDG) (1)	5,1
Frunze	
Soia, *Glycine max* (50 ZDI) (1)	< 0,1

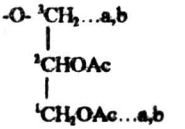
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Fasole Adzuki, *Vigna angularis* (8 ZDI) (1)	< 0,1
Idem (36 ZDI) (1)	< 0,1
Spanac, *Spinacia oleracea* (1)	1,3
Ridichi, *Raphanus sativus* (1)	0,7
Orez, *Oryza sativa* (30-75 ZDI) (5)	1,2-2,8
Tulpină	
Fasole Adzuki, *Vigna angularis* (8 ZDI) (1)	< 0,1
Orez, *Oryza sativa* (30-137 ZDI) (5)	1,2-2,8
Rădăcină	
Fasole Adzuki, *Vigna angularis* (8 ZDI) (1)	1,3
Idem (36 ZDI) (1)	1,7
Fasole, *Phaseolus vulgaris* (5 ZDG) (1)	5,9
Orez, *Oryza sativa* (57 ZDI) (1)	< 0,1
Teci	
Fasole Adzuki, *Vigna angularis* (40 ZDI) (1)	< 0,1
Organe generative	
Antere de cartofi (1)	2,3
Stil (1)	< 0,1
Stigmă (1)	2,7
Pistil de trifoi (1)	< 0,1
Muguri de varză (1)	< 0,1

* Structura glicozidică identificată a fost Galß1-6Galß1-3'DAG.
† Numerele din paranteză arată numărul de varietăţi studiate.
‡ ZDI, zile după înflorire
§ ZDG, zile după germinare

Structura glicogliceroliPidelor a fost elucidată, între altele, prin spectroscopia RMN ^1H (Tabelul 45). (Prescurtările sunt următoarele: DGDG(A), Galα1-6Galß1-3'diglicerid: DGDG(B), Galß1-6Galß1-3'-diglicerid; TGDG(A), Galß1-6Galα1-6Galß1-3'diglicerid; TGDG(B), Galß1-6Galß1-6Galß1-3'diglicerid; TeGDG(A), Galß1-6Galß1-6Galα1-6Galß1-3'diglicerid; TeGDG(B), Galß1-6Galß1-6Galß1-6Galß1-3'diglicerid.

Tabelul 45. Deplasările chimice ale semnalelor protonice în fragmentul glicerol al derivaţilor acetilaţi ai glicogliceroliPidelor deacilate (ppm).



Compus acetilat	1a	1b	2	3a	3b
DGG(A)	4,317dd	4,122m	5,184m	3,676dd	3,983dd
DGG(B)	4,305dd	4,144m	5,172m	3,670dd	3,990dd
TGG(B)	4,302dd	4,143m	5,160m	3,661dd	3,994dd
TeGG(B)	4,305dd	4,144m	5,154m	3,663dd	3,998dd
DGG din DGDG					

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

de grâu	4,307dd	4,122m	5,184m	3,675dd	3,983dd
MGG*	4,31d	4,15m	5,19m	3,70dd	3,96dd
DGG*	4,31d	4,15	5,19m	3,68dd	3,98dd

Abrevieri: dd, dublet dublu; m, multiplet; d, dublet. * Preluate din literatură (P. Baruah şi colab., 1983).

Monoglucozil-DAG este un precursor de biosinteză al Gal-DAG la cianobacterii, transformarea realizându-se prin epimerizarea Glc la Gal. Gal-DAG a fost găsită la 30 de specii de alge albastre-verzi (G. B. Feige şi colab., 1980) şi la algele verzi procariote dar nu la algele eucariote (N. Murata şi I. Nishida, 1987). Glicoglicerolipide pe bază de Glc au fost găsite în tărâţe de orez (Y. Fujino şi T. Miyazawa, 1979), făină de grâu (S. Ito şi colab., 1983) şi seminţe de porumb (H. Tanaka şi colab., 1984).

3.2. Glicosfingolipide

Distribuţia unor GSL în sistemul nervos de la diferite specii este cuprinsă în Tabelul 46 (N. Okamura şi colab., 1985).

Tabelul 46. Distribuţia unor glicosfingolipide în sistemul nervos de la diferite specii.

Specia	Lipide totale (mg/g ţesut umed)	Glc-Cer (AGN)	GalCer		Sulfatid	
			AGN	AGH	AGN	AGH
Protostomia						
CEPHALOPODA						
Octopus dolfrimi martini						
Ganglion cefalic	24,2	7,3	-	-	-	-
Nervul periferic G	23,7	11,2	-	-	-	-
Nervul periferic N	20,6	39,8	-	-	-	-
OLIGOCHAETA						
Lumbricus terestris						
Nerv ventral	18,6	54,3	-	-	-	-
		-78-				
MEROSTOMATA						
Limulus polyphemus						
Nerv ventral	10,1	14,5	-	-	-	-
Nerv branhial	10,2	20,0	-	-	-	-
Nerv optic	5,7	8,9	-	-	-	-
Membre înotătoare	7,5	18,3	-	-	-	-
CRUSTACEA						
Penaeus aztecus						
Ganglion cefalic	20,3	752	-	-	-	-
Nerv ventral	65,0	5,07	-	-	-	-
Nerv optic	92,0	4,2	-	-	-	-
Antena	15,4	1,48	-	-	-	-
Penaeus duorarum						

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Nerv ventral	57,9	6,58	-	-	-	-
Penaeus setiferus						
Nerv ventral	45,8	3,5	-	-	-	-
Alpheus heterochaelis						
Nerv ventral	40,8	9,97	-	-	-	-
Palaemonetes pugio						
Nerv ventral	42,0	4,26	-	-	-	-
Holmarus americanus						
Ganglion cefalic	13,2	84,5	-	-	-	-
Nerv ventral	10,2	134,0	-	-	-	-
Nerv brahial	10,0	83,0	-	-	-	-
Antena	6,1	55,5	-	-	-	-
Procambarus spp						
Ganglion cefalic	1,5	28,5	-	-	-	-
Nerv ventral	10,9	76,3	-	-	-	-
Callinectes sapidus						
Ganglion cefalic	12,4	17,3	-	-	-	-
Nerv ventral	10,5	21,2	-	-	-	-
Nerv brahial	10,5	12,3	-	-	-	-
Nerv optic	10,2	3,0	-	-	-	-
Antenă	5,0	8,5	-	-	-	-
Membre înotătoare	4,8	25,7	-	-	-	-
Ocypode quadrata						
Nerv ventral	8,6	8,0	-	-	-	-
Nerv optic	21,7	17,4	-	-	-	-
Clibanarius vittatus						
Nerv ventral	49,6	6,1	-	-	-	-
INSECTA						
Melanoplus differentialis						
Nerv ventral	4,6	-	-	-	-	-
Cap	50,8	0,3	-	-	-	-
Polyrhachis lamelliclens						
Cap	4,6	8,8	-	-	-	-
Deuterostomia						
ASTEROIDEA						
Echinaster spinulosus						
Nerv radial	21,3	-	10,4	182	ur	ur
LEPTOCARDII						
Branchiostoma floridae						
Nerv ventral	3,7	-	6,3	13,9	0,8	ur
CHONDRICHTHES						
Carcharinus plumbeus						
Creier	44,3	ur	6,0	957	3,5	70
OSTEICHTHYES						
Opsanus tau						
Creier	140	891	8,8	972	3,8	401
Fundulus grandis						
Creier	64,0	ur	2,3	505	1,4	139

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Cord spinal	97,4	ur	2,7	185	1,39	41
AMPHIBIA						
Rana catesbiana						
Creier	-	ur	3,2*		790*	
Cord spinal	-	-	4,5*		1,1*	
MAMMALIA						
Rattus norvegicus						
Creier	98,7	54	19,1*		3,9*	
Homo sapiens						
Substanţa albă	-	ur	16,0	19,5	6,5	1,6
Substanţa cenuşie	-	-	3,1	4,1	1,1	280

* Nu au fost separaţi AGN de AGH ci au fost dozaţi AG totali

GlcCer a fost găsit în sistemul nervos al peştilor gadoizi (Y. Tamai şi colab., 1993). Glicosfingolipidele au fost găsite iniţial în creier (R. Kuhn şi colab., 1963; L. Svennerholm,1963) iar ulterior în multe ţesuturi ale vertebratelor: rinichi şi splină de cal (S. Gasa şi A. Makita, 1980), glande suprarenale de cobai (M. Sekine şi colab., 1984), plasmă sanguină (G. Hanagata şi colab., 1990). Gangliozidul GM1a a fost utilizat ca agent farmacologic capabil să mărească gradul de recuperare după accidente cerebrale (J. C. Samson, 1990). Pe măsură ce tabloul glicolipidelor a devenit mai complet s-a observat că structura şi constituţia lor depinde de provenienţă.

Eritrocitele de şobolan conţin următoarele GSL: HexCer, di-HexCer, tri-HexCer, tetra-HexCer, gangliozidul GM1, Fuc-GM1, GD1a (M. Iwamori şi colab., 1983).

Gangliozide cu mobilitate cromatografică scăzută relativ la GD1a au fost decelate în lichidul amniotic (R. Rueda şi colab., 1993).

Din meconium uman au fost izolate două gangliozide cu următoarea structură: NeuAcα2-6Galß1-4GlcNAcß1-3(Galß1-4GlcNAcß1-6)Galß1-4Glcß1-1'Cer;NeuAcα2-6Galß1-GlcNAcß1-3(Galß1-4GlcNAcß1-6)Galß1-4GlcNAcß1-3Galß1-1'Cer (T. Taki şi colab., 1992).

Limfocitele din splina de şobolan conţin un disialogangliozid cu următoarea structură: NeuGcα2-3Galß1-4GlcNAcß1-3Galß1-3GalNAcß1-4(NeuGcα2-3)Galß1-4Glcß1-1'Cer (K. Nohara şi colab., 1992).

S-a găsit că componentul major al glucozilceramidelor din epidermă umană şi din epiderma de suine este 1-(3'-O-acil)-ß-glucozil-N-dihidroxipentatriacontadienoilsfingozina. Studii de permetilare au indicat că gruparea acil este ataşată în poziţia 3 a hexozei (exclusiv glucoză, la om, 80% glucoză la suine). Acidul major ataşat printr-o legătură ester este acidul octadecadienoic. Acidul ataşat printr-o legătură amidică la sfingozină posedă 35 atomi de carbon şi este un acid dihidroxidienoic (G. M. Gray şi colab., 1978). Ulterior, Wertz şi Downing (1983) au arătat că, în cazul acil-glucozil-ceramidelor din epidermă de suine, acidul gras ataşat la glucoză este acidul linoleic iar gruparea acil de la legătură amidică este alcătuită de o serie de ω-hidroxi-AG cu o lungime a catenei de 20-34 atomi de carbon. Mai târziu, Hamanaka şi colab., (1989) au purificat din epidermă umană trei derivaţi GSL: Glcß1-N-(ω-O-linoleoil)-triacontanoil-şi, respectiv, -dotriacontamonoenoil-eicosasfingenină precum şi Glcß1-N-(ω-O-linoleoil)triacontanoil-trihidroxieicosasfingenină. Amestecul primilor doi compuşi a dat următoarele rezultate la analiza RMN protonică: (a) protonii metilici prezintă două triplete suprapuse iar măsurarea intensităţii semnalelor a indicat două grupări metil (δ 0,88 şi 0,89 ppm, J 6,8 Hz); (b) protonii metilenici din poziţia 3 faţă de gruparea carbonil (-$\underline{CH_2}$-CH_2-C=O, -NH-CO-CH_2-$\underline{CH_2}$- : 1,62 ppm); (c) protonii metilenici adiacenţi legăturii duble (-$\underline{CH_2}$-CH=CH-CH_2-

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

CH CH-CH_2-, -CH_2-CH CH-CH(OH)- : 2,04ppm); (d) protonii metilenici din poziţia 2 faţă de gruparea carbonil a legăturii amidice (-NH-CO-CH_2- : 2,19 ppm, 7,8 Hz); (e) protonii metilenici din poziţia 2 faţă de gruparea carbonil a legăturii ester (-CH_2-COO CH_2- : 2,30 ppm, 6,8 Hz); (f) protonii metilenici dintre cele două legături duble (2,77 ppm, 6,8 Hz); (g) protonii metilenici adiacenţi legăturii ester (-CH_2-COO-CH_2- : 4,06 ppm, 6,8 Hz); (h) protonul anomer al ß-glucozidului (4,26 ppm, 7,8 Hz); (i) protonii legăturii duble *cis* a acizilor graşi (5,35 ppm); (j) protonii legăturii duble *trans* a sfingozinei de la C4 şi C5 (5,46 şi 5,71 ppm). Hidroliza alcalină selectivă a amestecului a avut următoarele consecinţe:

- a suprimat semnalele (e) şi (f);
- a produs o deplasare a semnalului (g) la 3,63 ppm, care a fost atribuită protonilor metilenici de la atomul de carbon care posedă o grupare hidroxil;
- a făcut să dispară unul dintre cele două semnale triplet suprapuse a grupării metil (0,89 ppm), indicând că componenţa alcali-stabilă conţine o singură grupare metil terminală;
- intensitatea semnalului (i) a scăzut la aproximativ 25%, indicând că aproximativ 75% din peak-ul (i) este datorată acidului linoleic; s-a observat, în compusul alcali-stabil, o mică proporţie de legătură dublă *cis*, care a fost atribuită AG legat amidic sau sfingozinei.

Deplasările chimice ale semnalelor (a)-(i), în cazul celui de-al treilea GSL, au fost identice cu cele de mai sus. Semnalul (j) (5,66 ppm, 5,9 si 15,6 Hz şi 5,74 ppm, 5,9 şi 15,6 Hz) este unic şi a fost atribuit protonilor legăturii duble *trans*. Structurile posibile care dau acest semnal sunt fie trihidroxi-sfingozina conţinând o legătură dublă în zona C5-ω2 fie un AG conţinând o legătură dublă trans; ultimul este puţin probabil deoarece legăturile duble din AG naturali sunt *cis*. Hidroliza alcalină selectivă a compusului a produs schimbări similare a semnalelor cu amestecul de mai sus: dispariţia semnalelor (e)-(f), deplasarea lui (g) şi descreşterea intensităţii lui (i).

Din dermă şi din epidermă de cobai a fost izolat N-(O-linoleoil) ω-hidroxi acil gras sfingozil glucoza (lipokeratinogenozid) (Y. Uchida şi colab., 1990).

Din ser sanguin uman au fost purificate următoarele GSL: monohexozil-ceramid (GlcCer), dihexozil-ceramid, trihexozil-ceramid şi GalNAc-trihexozil-ceramid; primii doi compuşi constituie 4/5 din total (E. Svennerholm şi L. Svennerhom, 1963).

Din eritrocite bovine au fost izolate şi caracterizate trei monosialogangliozide din seria lacto denumiţi provizoriu G1, G2, G3 (S. Dasgupta şi colab., 1994); puritatea compuşilor a fost verificată prin CSS. Elucidarea structurii a parcurs următoarele etape:

1.Compoziţia chimică şi poziţia legăturilor glicozidice. AG predominant pentru toate trei gangliozidele este C18:1; ceilalţi AG majori sunt C16:0, C18:0, C20:0 şi C22:1. Sfingozina d18:1 este BCL majoră. G1 conţine AS, Glc, Gal şi GlcNAc în raportul molar 1:1:4:3. Atât G2 cât şi G3 conţin o moleculă suplimentară de Gal per moleculă, în comparaţie cu G1. Masa moleculară a oligozaharidului lui G3, eliberat din GSL cu endoglicoceramidază, este 1908, după cum a indicat ionul pseudomolecular $[M-H]^-$ la m/z 1907,3 în spectrul de masă FAB. Astfel de date au stabilit că unitatea CHO a lui G3 este un decazaharid care conţine NeuGc:Hex (Gal+Glc):GlcNAc în raportul molar 1:6:3. Prin urmare G1 este un nonazaharid constând din NeuGc:Hex (Gal+Glc):GlcNAc în raportul molar 1:5:3. Poziţiile legăturilor glicozidice în G1, G2 şi G3 au fost determinate prin CGL-SM a alditol acetaţilor parţial metilaţi rezultaţi în urma permetilării. Au fost identificaţi următorii derivaţi: 2,3,4,6-tetra-O-metilgalactitol-1,5-diacetat; 2,4,6-tri-O-metilgalactitol-1,3,5-triacetat; 2,3,6-tri-O-metilglucitol-1,4,5-triacetat; 3,6-di-O-metil-(N,N-acetil, metil)glucitol-1,4,5-triacetat şi 2,4-di-O-metilgalactitol-1,3,5,6-tetraacetat. Raportul acestor derivaţi pentru G1 este de 1:2:1:3:1. G2 şi G3, în comparaţie cu G1, conţin un mol suplimentar de Gal, care devine 2,4,6-tri-O-metilgalactitol-1,3,5-triacetat. Aceste date arată că oligozaharidele au o moleculă de Glc legată la Cer şi implicată într-o legătură C4, precum şi o

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

moleculă Gal într-o ramificaţie, legată C3 şi C6. Una dintre ramuri se termină într-un rest Gal iar cealaltă într-un rest de AS (care nu este decelat prin analiza de permetilare de mai sus).

2.Determinarea secvenţei carbohidrat a gangliozidelor prin tratare cu exoglicozidaze. Cele trei gangliozide, G1, G2 şi G3, în stare nativă, au fost hidrolizate cu exoglicozidaze; au rezultat produşi care comigrau cu NeuAc/NeuGc-nLc6Cer şi rezistau la hidroliza în continuare cu α- şi/sau ß-galactozidază şi ß-hexozaminidază. G1, spre deosebire de G2 şi G3, nu este hidrolizat de către α-galactozidază, de unde rezultă absenţa α-Gal-terminale. Toate trei gangliozidele sunt hidrolizate, cu α-neuraminidază în absenţa detergentului, la glicolipide neutre. Incubarea lui asialo-G1 cu ß-galactozidaza îl transformă pe acesta într-un compus asemănător nLc6Cer. Tratamentul alternativ cu ß-hexozaminidază şi ß-galactozidază transformă hexaozilceramidul în tetra-, tri-, şi diglicozilceramid. Aceste date sugerează că G2 şi G3 se termină într-un rest α-Gal la una dintre ramificaţii şi cu AS la cealaltă. Ambele ramuri constă în plus dintr-o unitate N-acetillactozamină şi sunt legate la un tetrazaharid constând din Galß-GlcNAcß-Galß-Glc. Ramân să fie stabilite şi localizate ramurile ce poartă resturile de AS şi respectiv α-Gal, precum şi diferenţa dintre G2 şi G3.

3.Spectroscopia RMN protonică. S-a observat că este imposibil de atribuit, într-o manieră lipsită de echivoc, semnalul fiecărui proton lucrând pe gangliozidele native, prin metoda RMN monodimensională. De aceea, gangliozidele au fost clivate în prealabil cu endoglicoceramidază iar fragmentele rezultate au fost analizate separat. Interpretarea spectrelor RMN ale oligozaharidelor G1, G2 şi G3 s-a realizat prin comparaţie cu datele privind oligozaharidele de tip N-acetillactozamină. Combinaţia 2D DQF-COSY şi TOCSY a fost utilizată pentru identificarea sistemelor de spin a resturilor individuale glicozil. Procedeul este ilustrat pentru oligozaharidul lui G3; particularităţile resturilor glicozil au fost observate prin intermediul semnalelor α-anomere la δ 5,219 şi 5,145, prin intermediul celor opt semnale ß-anomere (4,40<δ<4,75), şi deasemenea prin intermediul celor două semnale protonice CH_2 cuplate reciproc la δ 1,815 şi 2,775. Deplasările chimice ale protonilor sunt prezentate în Tabelul 47. Subspectrele TOCSY au fost atribuite resturilor glicozidice constituente ale fragmentului oligozaharidic G3 (cinci Gal, trei GalNAc, un NeuGc şi un Glc) bazat pe geometria caracteristică a inelului respectiv. Semnalele de la δ 1,81 si 2,77 au fost atribuite protonilor H3ax şi H3eq a restului NeuGc în virtutea deplasărilor lor chimice, modelului lor triplet şi dublet de dublet şi cuplarea lor reciprocă (geminală). Singletul cu δ 4,121 a fost atribuit protonilor metilenici NGc a acestui rest. Semnalul protonului anomer de la 5,145

Tabelul 47.Deplasările chimice protonice din oligozaharidele eliberate din G1, G2, G3 şi desemnate, respectiv, OG1, OG2, OG3.

		Deplasarea chimică		
Fragment	Grupare	OG1	OG2	OG3
Glc-Iα*	H1	5,220	5,220	5,219
Glc-Iß	H1	4,663	4,663	4,662
	H2	3,280	3,280	3,280
Gal-II	H1	4,438	4,438	4,438
	H4	4,152	4,153	4,150

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

GlcNAc-III	H1	4,692	4,693	4,692
	NAc	2,040	2,040	2,040
Gal-IV	H1	4,463	4,462/4,466**	4,461
	H4	4,152	4,153	4,150
GlcNAc-V	H1	4,707	4,705	4,710/4,706**
	NAc	2,030	2,030	2,028
Gal-VI	H1	4,562	4,558	4,560
	H3	4,125	4,115	4,127
Neu(Ac/Gc)	H3ax	1,816	1,799	1,815
	H3eq	2,779	2,758	2,775
	NAc/NGc	4,121	2,031	4,121
GlcNAc-VII	H1	4,641	4,637	4,636
	NAc	2,059	2,060	2,060
Gal-VIII	H1	4,466	4,538	4,537
	H4	-	4,183	4,183
Galα	H1	-	5,146	5,145
	H5	-	4,200	4,199

* Glucidele au fost numerotate astfel, în ordinea inversă a eliberării lor cu exo-glicozilhidrolaze:
VI V VIII VII IV III II I
NeuGcα2-3Galß1-4GlcNAcß1-3(Galα1-3Galß1-4GlcNAcß1-6)Galß1-4GlcNAcß1-3Galß1-4Glc-
**Semnalul se observă dublat în raportul de intensitate anomer

a fost atribuit restului Gal legat α. Spectrele COSY şi TOCSY indică faptul că semnalele Galα H2, H3 şi H4 cu conformaţie caracteristică apar la δ 3,858, 3,949 şi, respectiv, 4,019 ppm. Semnalele date de H1 la 5,219 şi 4,662 aparţin formelor anomere α şi ß a restului reducător de Glc a lui OG3 (v. Tabelul 5). Astfel de consideraţii, precum şi corelarea datelor obţinute pe căi independente au arătat că structura glicolipidelor G1, G2 şi G3 din eritrocite bovine este, respectiv, următoarea:

NeuGcα2-3Galß1-4GlcNAcß1-3(Galß1-4GlcNAcß1-6)Galß1-4GlcNAcß1-3Galß1-4Glcß1-Cer;
NeuAcα2-3Galß1-4GlcNAcß1-3(Galα1-3Galß1-4GlcNAcß1-6)Galß1-4GlcNAcß1-3Galß1-Glcß1-Cer; NeuGcα2-3Galß1-4GlcNAcß1-3(Galα1-3Galß1-4GlcNAcß1-6)Galß1-4GlcNAcß1-3Galß1-4Glcß1-Cer.

Din granulocite umane normale au fost izolate şi caracterizate structural gangliozide fucozilate din seria neolacto cu catene liniare poli-N-acetillactozaminil. Unul dintre gangliozide a fost identificat ca fiind antigenul sialil Lewis^x, cu miezul structural nLc6Cer, având următoarea structură: Neu5Acα2-3Galß1-4(Fucα1-3)GlcNAcß1-3Galß1-4GlcNAcß1-3Galß1-4Glcß1-1Cer. În plus au fost găsite: deca-, undeca-, dodeca- şi trideca-hexozil-ceramide monosialosilate cu trei (nLc8Cer) si patru (nLc10Cer) repetări de unităţi lactozaminil, conţinând suplimentar între una şi trei unităţi de Fuc (J. Müthing şi colab., 1996).

Din mucoasa intestinală de şoarece au fost izolate două GSL neutre: GlcCer şi asialo-GM1 (Y. Umesaki şi colab., 1981). Porţiunea ceramidică a ambelor GSL este extrem de hidrofilă, explicaţia fiind că mai mult de 90% din ceramid este compus din fitosfingozină şi 2-hidroxi-AG. În membrana microvilului a fost indusă biosinteza fuco-asialo-GM1, compusul fiind decelat prin încorporarea fucozei radiomarcate *in vivo*; compusul a fost biosintetizat *in vitro* utilizând ca precursori asialo-GM1 şi GDP-[^{14}C]fucoză cu omogenate de mucoasă intestinală. Primul GSL dădea prin permetilare-acetoliză 2,3,4,6-tetra-O-metil-1,5-di-O-acetil glucitol iar cel de-al doilea

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

dădea: 2,3,4,6-tetra-O-metil-1,5-di-O-acetil galactitol, 2,3,6-tri-O-metil-1,4,5-tri-O-acetil galactitol, 2,3,6-tri-O-metil-1,4,5-tri-O-acetil glucitol și 4,6-di-O-metil-1,3,5-tri-O-acetil-2-deoxi-2-N-metilacetamido galactitol în raport molar 1:1:1:1.

Din ser bovin au fost separate și caracterizate șase GSL: monohexozil-ceramide (GalCer și GlcCer în raport molar 1:4), dihexozil-ceramide (LacCer și di-GalCer) un trihexozil-ceramid și un tetrahexozil-ceramid (B. L. Slomiany și M. I. Horowitz, 1970).

4. Glicolipide și fosfolipide ale unor animale inferioare

Sfingolipidele organismelor inferioare pot fi clasificate, conform constituenților lor, în fosfosfingolipide (PSL) și glicosfingolipide (GSL). PSL major al vertebratelor este sfingomielina, în timp ce nevertebratele (cu excepția echinodermelor) conțin îndeosebi fosfonosfingolipide (PnSL) caracterizate prin existența legăturilor C-P, și/sau ceramid fosfonoetanolamina (CPEA). PnSL ca ceramid aminoetilfosfonat este larg răspândit la Protozoare, Porifere, Coelenterate și diferite protostomia ca de ex. Moluște, Artropode și Nematode. CPEA se găsește deasemenea la animale inferioare cum sunt insectele diptere, crustaceele și anumiți melci. Organismele, precum și sistematizarea lor filogenetică, a căror glicolipide au fost studiate, sunt prezentate în Tab. 48 și Tab. 49.

4.1. Fosfosfingolipide

Fosfosfingolipidele sunt de două tipuri: fosfosfingolipide, care conțin exclusiv legături ester ale acidului ortofosforic (de ex. sfingomielina) și fosfonosfingolipide, care conțin legătura C-P.

4.1.1. Fosfonosfingolipide

În organismele inferioare au fost găsite două PnSL: (I) ceramid aminoetilfosfonatul (CAEPn), al cărui constituent polar este acidul aminoetilfosfonic (AEPn); și (ii) ceramid N-metilaminoetilfosfonatul (CMAEPn), N-metil derivatul AEPn (Fig. 26).

Tabelul 48. Poziția filogenetică a organismelor la care au fost studiate glicolipidele.

Metazoare	Phylum (subphylum)	Clasa (subclasa)
Radiata	Coelenterata (sau Cnidaria)	Antozoare
Bilateralia		
Protostomia	Plathelminti	Cestode
	Nemathelminti (sau Nematode)	Trematode Nematode
	Moluste	Gastropode Bivalve (Pelecipode; Lamelibranchiate)
	Annelida	Oligochaeta
	Arthropoda (Mandibulata)	Crustacea

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

		Insecta (Pterygota)
Deuterostomia	Echinodermata (Echinozoa)	Holothuroidea
		Echinoidea
	Asterozoa	Stelleroidea (Asteroidea)
	Chordata (Vertebrata)	

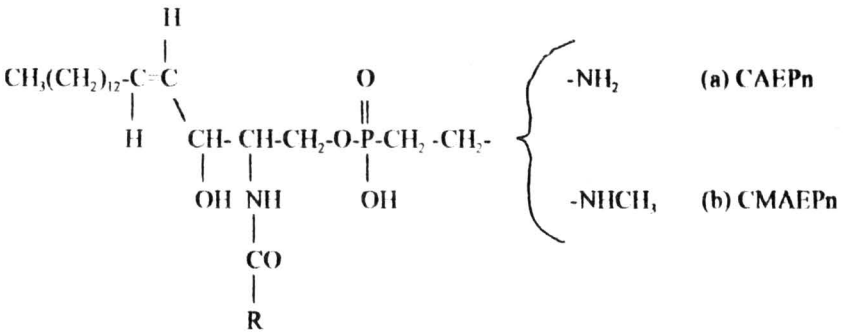


Fig. 26. Structura chimică a două fosfonosfingolipide: (a) N-acil-sfingosil-1-O-(2'-aminoetil)fosfonat; (b) N-acil-sfingosil-1-O-(N-metil-2'-aminoetil)fosfonat

Tabelul 49.Organisme inferioare la care au fost studiate glicolipidele.

Genul şi specia	Denumirea comună
Anthopleura midori	Anemonă de mare
Taenia taeniaeformis	Vierme panglică
Metroliastes coturnix	
Echinococcus multilocularis multilocularis	
Schistosoma mansoni	Gălbează
Trichuris globulosa	Parazit intestinal
Turbo cornutus	Melc de mare
Monodonta labio	Melc de mare
Chlorostoma argyrostoma turbinatum	Melc de mare
Nerita albicilla	Melc de mare
Liolophura japonica	Melc de mare
Lingula unguis	Melc de mare
Aplysia kurodai	"Iepure de mare"
Heterogen longispira	Melc de apă dulce
Pugilina ternatana	

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Cellana eucosmia	
Hyripsis schlegelii	Bivalvă de apă dulce
Anodonta woodiana	
Cristaria plicata	
Corbicula sandai	
Meretrix lusoria	Bivalvă de mare
Ostrea gigas	
Lumbricus terestris	Râmă
Pheretima hilgendorfi	Râmă
Euphausia superba	Krill antarctic
Penaeus aztecus aztecus	Crevete
Aedes albopictus	Ţânţar
Musca domestica	Musca de casă
Lucilia caesar	Musca verde
Calliphora vicina	Musca de carne
Anthocidaris crassispina	Arici de mare
Strongylocentrotus intermedius	Arici de mare
Echinocardium cordatum	Arici de mare
Hemicentrotus pulcherimus	Arici de mare
Asterina pectinifera	Stea de mare
Pateria pectinifera	Stea de mare
Evasterias retifera	Stea de mare
Aphelasterias japonica	Stea de mare
Asterias amurensis	Stea de mare

Distribuţia fosfonosfingolipidelor la diferite specii. Concentraţia relativă a celor două tipuri de PnSL variază considerabil la diferite specii animale (Tab. 50). Anumite protozoare conţin ambii compuşi, în timp ce moluştele şi Celenteratele conţin predominant CAEPn.

Tabelul 50.Conţinutul de fosfonosfingolipide* la Protozoare, Moluste şi Celenterate (% din fosfolipide).

	PnSL	CAEPn	CMAEPn
Protozoare			
Tetrahymena pyriformis W	11*	+	++
Tetrahymena pyrifirmis WH-14	5*	++	+
Mollusca			
Liolophura japonica	37,4	++	+
Turbo cornutus			
musculatură	10,6	-	+++
viscere	8,2	-	+++
Mondonta labio	16,2	-	+++
Tegula lischkei	33,1	+	++
Conomurex luhuanus	20,7	+++	-
Cellana eucosmia	14,5	+++	-
Ostrea gigas			
aductor	45,2	+++	-

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

branhii	22,2	+++	-
manta	21,0	+++	-
viscere	19,2	+++	-
Mytilus edulis	25,6	+++	-
Hyriopsis schlegelii			
oua	16**	++	+
spermatozoizi	7**	++	+
Hinnites giganteum	17	+++	-
Haliotis corrugata	9	++	-
Celenterate			
Anthopleura elegantissima	19,9**	+++	-
Metridium senile	10***	++	+

* neincluzând PnGSL
** % din fracţia lipidica alcali-stabilă
*** % din lipidele totale

O excepţie de la această generalizare o constituie anumiţi melci ca de ex. *Turbo cornutus*, care conţin îndeosebi CMAEPn. Astfel de diferenţe sunt importante din punct de vedere filogenetic. În literatura de specialitate sunt descrise o serie de aspecte ca : distribuţia naturală, compoziţia chimică, metabolismul şi chiar funcţia biochimică; cu toate acestea funcţia fiziologică a fosfonolipidelor nu este cunoscută. Există preocupări multiple în această privinţă (T. Hori şi M. Sugita, 1993).

4.1.2. Ceramid fosfoetanolamina

În anul 1962 Crone şi Bridges au identificat CPEA în fracţia lipidică insolubilă în eter provenită de la muscă, *Musca domestica,* iar în 1973 Luukonen şi colab., au găsit CPEA în fracţia lipidică alcali-stabilă de la o linie de ţânţar, *Aedes albopictus*, dar trebuie menţionat că în aceste studii nu a fost stabilită structura precisă. Hori şi colab. au izolat CPEA în anul1965 dintr-un melc de apă dulce , *Heterogen longispira*, prezentând o serie de date analitice şi anumite proprietăţi fizice. Distribuţia CPEA pare să se limiteze, în cadrul organismelor studiate până acum, la insectele diptere, crustacei şi melcii mesogasteropozi. Este interesant că fragmentul ceramidic al CPEA de la diptere constă aproape în totalitate din tetradeca- şi hexadecasfinga-4-enină şi din acizi arahidic (C20:0) şi behenic (C22:0); aceasta compoziţie este în bun acord cu datele privind compoziţia GSL a dipterelor.

4.2. GLICOSFINGOLIPIDE

În ultima decadă, s-au bucurat de un interes crescând GSL de la nevertebrate ca: Moluştele, Artropodele, Anelidele, paraziţii şi Echinodermele: s-a constatat astfel că structura şi constituenţii acestora diferă într-un grad variabil de ai vertebratelor. Au fost izolate şi caracterizate până acum peste 20 de GSL neutre, 12 GSL polare cu grupări zwitterionice (fosfoetanolamină sau AEPn) şi 4 GSL acide conţinând acid uronic sau acid piruvic. O diferenţă izbitoare între GSL a vertebratelor şi nevertebratelor este absenţa aproape constantă a acidului sialic la încrengăturile nevertebrate de protostomieni, precum şi la deuterostomienii mai simpli studiaţi până acum (L. Warren, 1963; R. D. Dennis şi colab., 1987; M. Sugita şi colab., 1989).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Echinodermele, care constituie o excepţie notabilă de la această generalizare, conţin gangloziде cu structură atipică.

În capitolul de faţă vor fi descrise comparativ studii ale GSL de la nevertebratele inferioare cu scopul de a înţelege varietatea structurală şi rolul posibil al compuşilor respectivi la aceste organisme.

4.2.1. Glicosfingolipide din moluşte

4.2.1.1. Glicosfingolipide din bivalve

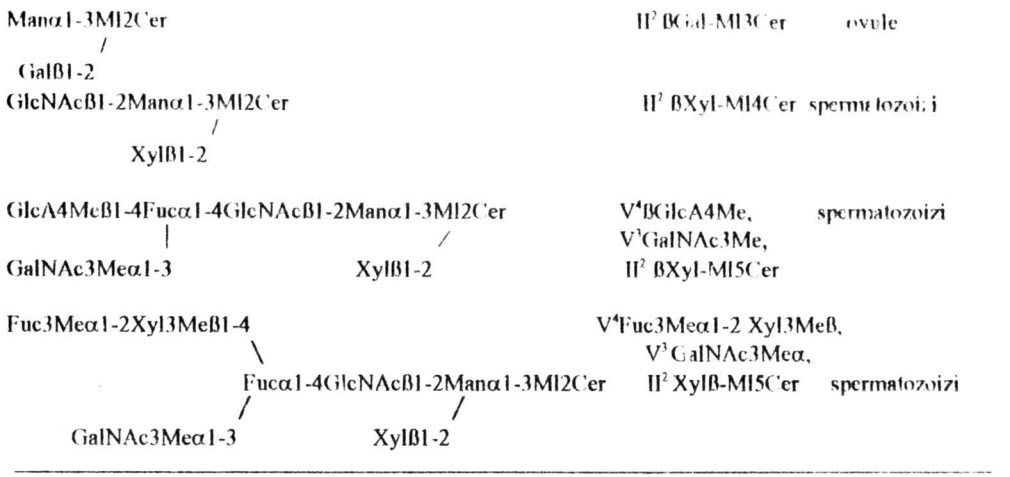
Studiul GSL moluştelor s-a intensificat după anul 1964. Printre studiile anterioare acestui an se numără cel al lui Nakazawa (1959) privind glicolipidele de la scoici. Mai târziu Hayashi (1973), lucrând în acelaşi domeniu, a găsit diferenţe importante faţă de rezultatele lui Nakazawa. Studii amănunţite, extinse pe o perioadă de aproximativ 30 de ani, au fost realizate pe scoica perliferă de apă dulce *Hyriopsis schlegelii* , care trăieşte în lacul Biwa. Bivalva respectivă este importantă şi pentru faptul că reprezintă o specie endemică. Bivalvele adulte care trăiesc în acest lac au o lungime de 23 cm şi o grosime de 13 cm. Ele au fost recoltate în lunile Aprilie şi Mai când ovarele sunt la maturitate optimă, după care au fost izolate GSL pentru a obţine dovada clară că celulele germinative sunt caracterizate în mod specific de anumite tipuri moleculare de GSL (Tab. 51). Tabloul global al GSL în spermatozoizi şi ovule este acum clar, urmând să fie studiate funcţiile lor.

Compoziţia şi structura GSL nevertebratelor, în comparaţie cu cele ale vertebratelor, sunt remarcabil de diferite. În primul rând, GSL al nevertebratelor implică în general una sau mai multe molecule de manoză adiacente, precum şi glucide cu structură aparte ca de ex. 3-O-metilxiloză, 3-O-metilgalactozamină, 3-O-metilfucoză şi acid 4-O-metilglucuronic. Deasemenea, fucoza este

Tabelul 51.Structura şi distribuţia glicosfingolipidelor în organele bivalvei de apă dulce, *Hyriopsis schlegelii.*

Structura	Abrevierea	Sursa
Glcß1-1'Cer		spermatozoizi, ovule
Galß1-1'Cer		spermatozoizi, ovule
Manß1-Cer		hepatopancreas
Manß1-4Glcß1-1'Cer	Ml2Cer	spermatozoizi, ovule
Manß1-2Manß1-1'Cer		hepatopancreas
Manα1-3Ml2Cer	Ml3Cer	spermatozoizi, ovule
Manα1-3Manß1-2Manß1-1'Cer		hepatopancreas
GlcNAcß1-2Ml3Cer	Ml4Cer	spermatozoizi, ovule
Manα1-2Ml3Cer		ovule
Manα1-3Ml2Cer / Xylß1-2	II^2 ßXyl-Ml3Cer	spermatozoizi, ovule

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



localizată în interiorul catenei oligozaharidice şi furnizează de fapt punctele de ramificare. O constatare interesantă o constituie absenţa la protostomia (la care aparţin scoicile şi insectele) a acelor gangliozide care se găsesc frecvent la deuterostomia, ca de ex., vertebratele (dar şi la echinoderme, v. mai jos), şi care au fost intens studiate în privinţa funcţiei biologice.

Un glicolipid conţinând acid 4-O-metilglucuronic, care se presupune că substituie gangliozidele, este prezent în formă acidă în spermatozoizii bivalvelor, care sunt plasate taxonomic în Paleoheterodonta, ca de ex *H. schlegelii, Anodonta woodiana* şi *Cristaria plicata* (M. Sugita şi colab., 1984). GSL acid este un ceramid octazaharid care posedă acid 4-O-metilglucuronic la capătul nereducător (Tabelul 51), şi este localizat în concentraţii ridicate în stratul exterior al celulelor spermatice. La bivalva marină *Meretrix lusoria* , compoziţia în GSL este foarte asemănătoare bivalvelor de apă dulce studiată până acum. O comparaţie preliminară a seriei mollu (v. Tabelul 51) de GSL de la Bivalvia sugerează că o astfel de paletă a GSL ar putea fi larg răspândită la familia *Veneridae* (ordinul Heterodonta). Structurile GSL şi distribuţia lor în organele bivalvelor de apă dulce sunt prezentate în Tabelul 51.

4.2.1.2. Glicosfingolipide din melci de mare

Prima investigare sistematică asupra naturii GSL de la melcii marini a fost relatată în anul 1975 de către Hayashi şi colaboratorii săi. Ei au extins domeniul cunoaşterii constituenţilor GSL prin descoperirea fracţiunii poligalactozil, derivaţi glucidici conţinând legătura C-P, şi îndeosebi prin dezvoltarea sistemului SM-BAR (spectroscopie de masă în urma bombardării cu atomi rapizi) pentru aplicaţii la analiza lipidelor din melci (T. Matsubara şi A. Hayashi, 1991). În anul 1981 au fost izolate cinci GSL din melcul marin *Turbo cornutus* din care patru au constituit o serie nouă de GSL conţinând exclusiv galactoză (seria gala-6-(neogala)). GSL aparţinând seriei gala-6- au fost ulterior găsite şi la alţi melci marini: *Monodonta labio, Chlorostoma argyrostoma turbinatum* şi *Nerita albicilla.* Alte glicolipide având exclusiv legături 1-6 includ glicogliceroli pide sulfatate izolate din sucul gastric uman, precum şi o serie de galactozildigliceride izolate din tărâţe de orez. Trebuie totuşi precizat că ultimele tipuri de lipide sunt glicerolipide şi nu GSL.

De o atenţie deosebită s-au bucurat PnGSL din melci; primul compus de acest gen a fost găsit într-un melc marin ca derivat al galactozilceramidului. Distribuţia PnGSL cu diferite catene glucidice a fost investigată la următorii melci de mare (Gastropoda): *T. cornutus, M. labio, C. a.*

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

turbinatum şi *Liolophura japonica*. Studiile structurale au indicat că există cel puţin două serii de catene glucidice, una constând numai din resturi de galactoză iar cealaltă constând din derivaţi lactozil conţinând fucoză. Unele PnGSL găsite până acum sunt prezentate în Tabelul 52.

Tabelul 52. Structura glicosfingolipidelor izolate din melcii de mare.

Structură	Sursă
Seria neogala	
Galß1-6Galß1-1'Cer (neogala biaozil-ceramid)	*Turbo cornutus*
Galß1-6Galß1-6Galß1-1'Cer (neogala triaozil-ceramid)	*T. cornutus*
Galß1-6Galß1-6Galß1-6Galß1-1'Cer	*Chlorostoma argyrostoma turbinatum*
Seria globo	
Fucα1-3GalNAcα1-3Galß1-4Glcß1-1'Cer | Fucα1-2	*Haliotis japonica*
Seria fosfono (lipide care conţin MAEPn)	
MAEPn-6Galß1-1'Cer	*T. cornutus* *Monodonta labio* *C. a. urbinatum*
MAEPn-6Galß1-6Galß1-6Galß1-1'Cer	*T. cornutus*
MAEPn-6 \ Fuc1-2Gal3Me1-3GalNAc1-3Gal1-4Glc-Cer / Gal1-2	*C. a. turbinatum*
MAEPn-6 \ Gal3Me1-3GalNAc1-3Gal1-3GalNAc1-3Gal1-4Glc-Cer / / / Fuc1-2 Fuc1-2 Gal1-2	*C. a. turbinatum*

Peste 70 de baze cu catenă lungă (BCL) naturale, inclusiv cele saturate (fitosfingozină), monoenoice, dienoice, au fost găsite în fragmentul ceramidic al GSL de la melcii marini. Recent a fost găsită o BCL trienoică conjugată, octadecasfinga-4, 8, 10-trienina, într-un GSL de la brahiopodul *Lingula unguis*, una dintre cele mai vechi fosile vii (A. Hayashi şi colab., 1990). Această BCL trienoică a fost găsita deasemenea în sfingolipidele obţinute de la anumite gasteropode (*M. labio, Cellana eucosmia,C. a. turbinatum* şi *Pugilina ternatana)*, pelecipode (*Ostrea gigas)* şi celenterate (*Anthopleura midori)*. Hayashi şi colab.,(1990) au identificat deasemenea o nonadecasfingatrienină la *P. ternatana.*

4.2.1.3. Glicosfingolipide din iepurele de mare

Satake şi colab., (1971) au studiat sistematic GSL şi PnGSL de la un gasteropod marin, *Aplysia kurodai* (iepurele de mare). PnGSL au fost identificate şi în alte gasteropode marine dar

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

structura catenei oligozaharidice a PnGSL de la iepurele de mare este mult diferită (A Hayashi şi T. Matsubara, 1989) (v. Tabelul 53)

Tabelul 53.Fosfonoglicosfingolipide găsite la iepurele de mare, *Aplysia kurodai*.

Structură	Sursă
AEPn-6 \ Gal3Meß1-3GalNAcα1-3Galß1-4Glcß1-Cer / AEPn-6Galα1-2	*Aplysia kurodai*
Gal3Meß1-3GalNAcα1-3Galß1-4Glcß1-Cer / AEPn-6Galα1-2 AEPn-6 AEPn-6 \ \ GlcNAc4Meα1-4GalNAcα1-3Galß1-4Glcß1-Cer / AEPn-6Galα2	*A. kurodai*
HOOC O AEPn-6 \ / \4 \ C Galß1-3GalNAcα1-3Galß1-4Glcß1-Cer / \ 3 / H_3C O Fucα1-2	*A. kurodai*

De ex., spre deosebire de PnGSL de la alţi melci marini, cele de la iepurele de mare conţin predominant AEPn mai degrabă decât MAEPn; acest constituent, alături de acidul piruvic, conferă aciditate acestei clase de PnGSL (v. Tabelul 53).

PnGSL conţinând acid piruvic au fost localizate la iepurele de mare în fasciculele nervoase . Această localizare restrânsă sugerează că PnGSLar putea avea o funcţie neurobiologică (Y. Watanabe, 1987). Pentru a investiga această posibilitate, au fost cercetate proprietăţile de suprafaţă a patru GSL încărcate negativ, inclusiv PnGSL de la iepurele de mare, în monostrat la interfaţa apă/aer. Adăugarea de Ca^{2+} a condensat monostraturile tuturor GSL şi a crescut potenţialul în direcţia valorilor mai pozitive, iar PnGSL de la iepurele de mare nu a fost marcată în mod deosebit (H. Beitinger şi colab., 1989).

Anumite particularităţi unice ale catenei glucidice a GSL de la moluştele marine (bivalvele, melcii marini) ar fi de aşteptat să aibă efecte semnificative asupra a cel puţin uneia dintre proprietăţile fizico-chimice ale glicolipidului. Aceste particularităţi sunt: (i) prezenţa formelor 3-O-metilate ale xilozei, fucozei, galactozei şi galactozaminei, precum şi derivaţii 4-O-metilaţi ai galactozei, glucozaminei şi acidului glucuronic; (ii) localizarea tuturor acestor glucide , cu excepţia 3-O-metilxilozei, la capătul nereducător al catenei glucidice. Deoarece glucidele O-metilate sunt mai puţin polare decât omologii lor nesubstituiţi, hidrofobicitatea acestor molecule lipidice, şi în consecinţă mediul lor înconjurător, ar fi mărite.

La gasteropodele marine sunt predominanţi derivaţii aminoalchilfosfonat ai GSL (PnGSL), iar ipotezele cu privire la funcţiile lor trebuie să ia în considerare următoarele aspecte:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

(i) sunt compuşi ionici; (ii) sunt distribuiţi în biomembrane; (iii) fosfonaţii sunt mai puţin flexibili decât fosfaţii. PnGSL ar putea avea rol de situsuri receptoare în transmiterea de informaţie.

Din ţesuturile de la *Aplysia kurodai* a fost izolată o nouă serie de fosfonoglicosfingolipide (S. Abe şi colab., 1986). Structurile a trei glicolipide majore izolate din piele sunt următoarele: Gal3Meß1-3GalNAcα1-3(AEPn-6Galα1-2) (AEPn-6)Galß1-4Glcß1-Cer (SGL-II), Gal3Meß1-3GalNAcα1-3(AEPn-6Galα1-2)Galß1-4Glcß1-Cer (SGL-I'), GlcNAc4Meα1-4GalNAcα1-3(AEPn-6Galα1-2) (AEPn-6)Galß1-4(AEPn-6)Glcß1-Cer (SGL -1). După cum se observă, cele trei fosfonoglicosfingolipide au un schelet oligozaharidic comun, GalNAcα1-3[Galα1-2]Galß1-4Glc, şi glucid metilat la capătul nereducător al catenei oligoglucidice. Analiza cromatografică a arătat că SGL-II şi SGL-I sunt prezente în piele, ganglioni şi fibrele nervoase de la *Aplysia*, iar SGL-I' este localizat îndeosebi în piele (S. Araki şi colab., 1987).

În fibrele nervoase de la *Aplysia kurodai* a fost identificat un fosfonoglicosfingolipid care conţine acid piruvic ataşat sub formă de cetal la O-3 şi O-4 a Gal terminale din catena oligozaharidică. Structura fosfonoglicosfingolipidului este următoarea: [3,4-O-(1-carboxi-etiliden)]Galß1-3GalNAcα1-3(Fucα1-2)(2-aminoetilfosfonil-6)Galß1-4Glcß1-1'Cer (FGL-IIb). Constituenţii alifatici majori ai glicolipidului sunt acidul palmitic, octadeca-4-sfingenina şi anteizononadeca-4-sfingenina (S. Araki şi colab., 1989). Iată principalele argumente care au dus la elucidarea structurii compusului FGL-IIb. Spectrele RMP ale compusului FGL-IIb au relevat, în regiunea anomeră, trei protoni ß şi doi protoni α. Cele trei peak-uri anomere au fost atribuite ß-glucozei (4,17 ppm, J=7,69 Hz), ß-galactozei interne (4,44 ppm, J=7,69 Hz) şi α-N-acetilgalactozaminei (5,03 ppm, J=3,29 Hz); atribuirea s-a realizat prin comparaţie cu alte fosfonoglicosfingolipide cu structură cunoscută şi derivaţi ai acestora ca SGL-II, SGL-II tratat cu HF şi SGL-I'. Dubletul de la 5,22 ppm (J=4,03 Hz) a fost atribuit protonului anomer al α-fucozei, alte deplasări chimice ale fucozei fiind 4,13 ppm (H-5) şi 1,09 ppm (gruparea metil C-6 a Fuc). Rezonanţa de la 4,13 ppm (H-5) indică deasemenea că restul fucozil este ataşat pe restul de galactoză internă printr-o legătură α1-2. În consecinţă, semnalul de la 4,39 ppm (J=7,69 Hz) a fost atribuit galactozei piruvilate terminale (Tabelul 54).

Peak-urile de la 1,86 şi 1,46 ppm indică protonii restului metil din gruparea N-acetil a GalNAc şi, respectiv, a grupării metil a acidului piruvic.

Rezultatele procedeului permetilare-acetoliză confirmă datele de mai sus. Astfel, rezultatele obţinute pledează, concomitent, pentru structura indicată a fosfonoglicosfingolipidului. Diagrama de fragmentare FAB este indicată în Fig 27 (valorile numerice sunt [M-H]⁻).

4.2.2. Glicosfingolipide din artropode

Artropodele sunt împărţite taxonomic în 11 clase, dar numai asupra a două dintre ele există informaţii publicate referitoare la GSL, Insecta şi Crustacea. Sugita şi Wiegandt au găsit la aceste organisme GSL cu structuri unice precum şi deosebiri mari, faţă de vertebrate, în constituenţii glucidici şi ceramide.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

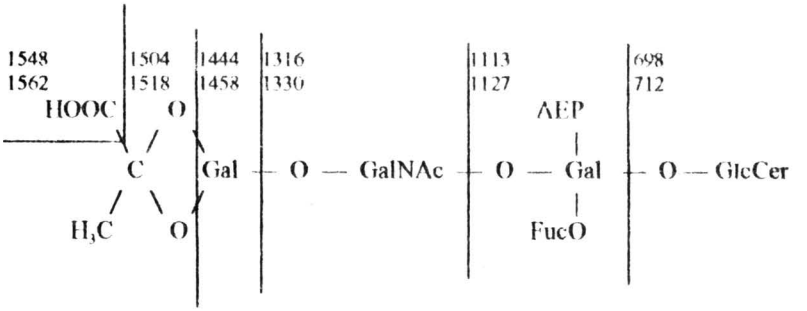


Fig 27.Fragmentarea prin FAB a unui GSL piruvilat.

Tabelul 54.Deplasările chimice (δ, ppm) şi constantele de cuplare ($J_{1,2}$, Hz) a protonilor anomeri ai FGL-IIb.

Proton anomer: Pyr-Galß1-3GalNAcα1-3[(Fucα1-2)(2-AEP-6)]Galß1-4Glcß1-Cer					
H-1 (ppm)	4,39	5,03	5,22	4,44	4,17
$J_{1,2}$ (Hz)	7,69	3,29	4,03	7,69	7,69

4.2.2.1. Glicosfingolipide de la insecte

Primele studii ale GSL din insecte au fost realizate în 1973 când Luukonen şi colab., au descris prezenţa CMH şi CDH la insectele diptere (celule de cultură provenite de la ţânţari, *Aedes albopictus*). S-a arătat deasemenea că aceste GSL sunt glucozil-, diglucozil- şi manozilglucozilceramide conţinând acid stearic ca principal AG şi tetradecasfinga-4-enină ca principală BCL.

O cercetare sistematică asupra naturii GSL a insectelor a început în anul 1982, prin utilizarea larvelor de la musca verde, *Lucilia caesar* (M. Sugita şi colab., 1982). Autorii respectivi au stabilit o nouă serie de GSL a insectelor având o catenă glucidică neramificată de până la nouă glucide, secvenţe şi legături anomere caracteristice. Această secvenţă oligoglucidică a fost denumită arthro, deoarece a fost întâlnită pentru prima dată la specii de artropode.

Pentru a obţine un tablou mai complet al GSL de la insecte, Dennis şi colab., (1985) au realizat un studiu sistematic al GSL de la alte insecte diptere, pupele muştei de carne, *Calliphora vicina*. Ei au elucidat până în prezent structurile a numeroase glicolipide aparţinând seriei arthro. Deşi există diferenţe cantitative ale GSL de la cele două specii, componentele GSL de la două insecte diptere, *L. caesar* şi *C. vicina*, sunt foarte similare din punct de vedere structural. Compoziţia în AG şi BCL sunt deasemenea similare, dominanţi fiind acidul arahidic şi tetradeca- şi hexadeca-4-sfingeninele. Marea similitudine a compoziţiei fracţiunilor ceramidice sugerează că toate seriile arthro- de GSL sunt derivate biogenetic de la Manß1-4Glcß1-1'Cer, care a fost numită mactozil-ceramid de către Wiegandt (prin analogie cu lactozil-ceramidul, Galß1-4Glcß1-1'Cer). Mactozil-ceramidul a fost găsit deasemenea la bivalvele de apă dulce şi la unele plante, prin urmare la organisme între care există o diferenţă apreciabilă din punct de vedere taxonomic.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Trebuie notat că secvențele oligoglucidice superioare ale seriei arthro- sunt neobișnuit de bogate în hexozamină, și că substituția ß-GalNAc la poziția C-4 cu un rest α-GalNAc nu a fost întâlnită până acum la glicoconjugatele vertebratelor. O altă structură neobișnuită, găsită la insecte, o constituie fosfo-etanolamina legată la C-6 a GalNAc (prezentă deasemenea la bivalva *Corbicula sendai* (O. Itasaka și T. Hori, 1979)). Prezența GSL sulfatate conținând acid glucuronic a fost relatată la *C. vicina* (R. Dennis și colab., 1987), în timp ce GSL de la *L. caesar* conțin deasemenea acid glucuronic (M. Sugita și colab., 1989) dar nu sulfatat (Tabelul 55).

Tabelul 55. Structurile chimice ale GSL seriei Arthro de la insectele *Lucilia caesar* și *Caliphora vicina*.

Structura	Abrevierea
LIPIDE NEUTRE	
Glcß1-Cer	GlcCer
Manß1-4Glcß1-Cer	MacCer
GlcNAcß1-3Manß1-4Glcß1-Cer	Ar_3Cer
GalNAcß1-4GlcNAcß1-3Manß1-4Glcß1-Cer	Ar_4Cer
GalNAcα1-4GalNAcß1-4GlcNAcß1-3Manß1-4Glcß1-Cer	Ar_5Cer
Galα1-3GalNAcß1-4GlcNAcß1-3Manß1-4Glcß1-Cer	IV^3aaAr_4Cer
Galß1-3GalNAcß1-4GlcNAcß1-3Manß1-4Glcß1-Cer	IV^3ßAr_4Cer
Galß1-3GalNAcα1-4GalNAcß1-4GlcNAcß1-3Manß1-4Glcß1-Cer	Ar_6Cer
GlcNAcß1-3Galß1-3GalNAcα1-4GalNAcß1-4GlcNAcß1-3Manß1-4Glcß1-Cer	Ar_7Cer
GalNAcß1-3GlcNAcß1-3Galß1-3GalNAcα1-4GalNAcß1-4GlcNAcß1-3Manß1-4Glcß1-Cer	Ar_8Cer
Galß1-3GalNAcß1-3GlcNAcß1-3Galß1-3GalNAcα1-4GalNAcß1-4GlcNAcß1-3Manß1-4Glcß1-Cer	Ar_9Cer
LIPIDE CONȚINAND FOSFOETANOLAMINĂ	
PEA-6GlcNAcß1-3Manß1-4Glcß1-Cer	III^6PEAAr_3Cer
GalNAcß1-4(PEA-6)GlcNAcß1-3Manß1-4Glcß1-Cer	III^6PEA-Ar_4Cer
GalNAcα1-4GalNAcß1-4(PEA-6)GlcNAcß1-3Manß1-4Glcß1-Cer	III^6PEA-Ar_5Cer
Galß1-3GalNAcß1-4(PEA-6)GlcNAcß1-3Manß1-4Glcß1-Cer	IV^3ßGal, III^6PEA-Ar_4Cer
Galß1-3GalNAcα1-4GalNAcß1-4(PEA-6)GlcNAcß1-3Manß1-4Glcß1-Cer	**III^6PEA-Ar_6Cer**
GlcNAcß1-3Galß1-3GalNAcα1-4GalNAcß1-4(PEA-6)GlcNAcß1-3Manß1-4Glcß1-Cer	III^6PEA-Ar_7Cer
LIPIDE ACIDE	
GlcAß1-3Galß1-3GalNAcß1-4GlcNAcß1-3Manß1-4Glcß1-Cer	IV^3ßGlcA, IV^3ßGal-Ar_4Cer
GlcAß1-3Galß1-3GalNAcα1-4GalNAcß1-4GlcNAcß1-3Manß1-4Glcß1-Cer	VI^3ßGlcA-Ar_6Cer
GlcAß1-3Galß1-3GalNAcß1-4(PEA-6)GlcNAcß1-3Manß1-4Glcß1-Cer	V^3ßGlcA, IV^3ßGal, III^6PEA-Ar_4Cer
GlcAß1-3Galß1-3GalNAcaa1-4GalNAcß1-4GalNAcß1-4(PEA-6)GlcNAcß1-3Manß1-4Glcß1-Cer	VI^3ßGlcA, III^6PEA-Ar_6Cer

4.2.2.2. Glicosfingolipide ale crustaceelor

GSL de la crustacee au fost puțin studiate. Recent, Itonori și colab., (1991) au studiat Glcß1-1'Cer și derivatul MAEPn corespunzător de la organismul antarctic *Euphausia superba*; exista date care arată că PnGSL este GSL predominant. Fragmentul ceramidic este alcătuit din tetradeca- și octadecasfingenine ca BCL predominante, și din C22:1, C24:1, precum și din derivații lor 2-hidroxi, ca AG majori. Shimomura și colab., (1983) au găsit că crevetele *Penaeus aztecus aztecus* conține concentrații înalte de GlcCer în cordonul nervos ventral, creier, nervul optic și antenă, dar nu în țesutul extraneural. Acest GSL conține baze sfingoide neobișnuite constând din sfinganine și sfingozine cu 14, 15 și 16 atomi de carbon. AG sunt îndeosebi omologi nehidroxilați cu mai mult de 22 de atomi de carbon. De fapt, compoziția ceramidelor GlcCer de la crevete seamănă mai mult cu aceea a GalCer din creierul vertebratelor decât cu GlcCer din aceeași sursă. Aceiași autori au arătat că GlcCer este localizat cu precizie în teaca membranoasă care înconjoară axonii nervului ventral al acestui animal (N. Okamura și colab., 1985).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

4.2.3. Glicofingolipide ale anelidelor

În ciuda interesului crescând faţă de anelide, pentru studiile de neurobiologie (N.Okamura şi colab., 1985), există informaţii relativ puţine asupra constituenţilor chimici ai sistemului nervos de la acestea, în particular compoziţia lipidică. Okamura şi colab., au investigat compoziţia lipidică a fibrelor nervului gigant de la râma *Lumbricus terrestris*. Nu au fost găsite nici GalCer nici sulfatidul (ambii compuşi sunt consideraţi markeri ai mielinei), dar au fost găsite urme de GlcCer.

Lucrări recente dintr-un alt laborator arată că ţesutul total de la viermele de pamânt *Pheretima hilgendorfii* conţine o serie de neogalalipide, drept componente neutre, precum şi o serie de GSL polare conţinând colinfosfat în poziţia C-6 a restului de galactoză (Tabelul 56). Prezenţa colinfosfatului ca

Tabelul 56.Glicosfingolipide izolate din ţesuturile râmei *Pheretima hilgendorfi*.

Neutre (seria neogala):
Galß1-Cer
Galß1-6Galß1-Cer
Galß1-6Galß1-6Galß1-Cer
Polare:
Colinfosforil-6Galß1-Cer
Colinfosforil-6Galß1-6Galß1-Cer

substituent pe fragmentul oligoglucidic a fost relatată pentu prima oară cu această ocazie. Fragmentul alifatic al GSL polare constă îndeosebi din AG cu C20:0 şi C24:0 şi din BCL octadeca- şi nonadeca-4-sfingenină. Luând în considerare similitudinea constituenţilor alifatici ai GSL neutre şi polare, pare probabil că GSL polare de la râmă sunt biochimic provenite de la galalipidele neutre.

GSL-fosfocolina izolată din râmă pare să aibă o distribuţie limitată la această specie, chiar în chiar în cadrul animalelor inferioare. Sfingomielina, un sfingolipid conţinând fosfocolina, larg răspândită în membrane, este absenţa din nervul ventral de la *Lumbricus terrestris*; se poate presupune că lipidul polar nou-descoperit are la râmă o funcţie analogă cu cea a sfingomielinei.

La anelidul marin *Neanthes diversicolor* a fost găsit următorul glicofosfolipid: colinfosforil-6-Galß1-1'Cer; Cer este N-hexadecanoil-(4E,8E)-sfingadienă. Legăturile duble ale sfingozinei au fost precizate, numeric şi poziţional, prin adiţia dimetil disulfurii la un derivat ceramidic al compusului parental urmată de analiza RMN şi SM a produsului de reacţie; prin această reacţie, la o legătură dublă se adiţionează două grupări SMe (N. Noda şi colab., 1993).

4.2.4. Glicosfingolipide ale echinodermelor

Echinodermele conţin mai multe GSL unice. La ariciul de mare, gangliozidele conţin (alături de acidul sialic) numai glucoză ca şi component glucidic (M.Hoshi şi Y. Nagai, 1975; N. V. Prokazova şi colab., 1981). La multe gangliozide de la steaua de mare acidul sialic apare in interior, dar şi legat la gruparea glicoloil a penultimului acid sialic (M.Sugita 1979; N. K. Kochetov şi G. P. Smirnova, 1983). Anumite gangliozide de la steaua de mare conţin arabinoză ca glucid terminal, substituind în poziţiile C-3 sau C-6 de la penultimul rest de galactoză. Studii sistematice ale gangliozidelor de la ariciul de mare sugereaza un schelet glucidic comun, compus

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

din glucoză şi acid sialic, ataşat la GlcCer în poziţia C-6; pe de altă parte, deşi sunt evidente structuri comune în gangliozidele de la *Asterina pectinifera*, se pare că nici un tip structural comun de gangliozid nu este caracteristic acestui organism luat ca întreg.

O mare diversitate de GSL neutre a fost găsită la acest phylum. Ouăle ariciului de mare, *Anthocidaris crassispina*, conţin GlcCer şi melibiozilceramid (Galα1-6Glcß1-1'Cer; H. Kubo şi colab., 1988); un trihexozil-ceramid nou şi un GSL difucozilat, Fucα1-3GalNAcß1-4(Fucα1-3)GlcNAcß1-4Glcß1-1'Cer, au fost găsite în ouăle altui arici marin, *Hemicentrotus pulcherrimus* (H. Kubo şi colab., 1992). GSL neutre găsite în spermatozoizii stelei de mare, *Asterias amurensis* , sunt Glcß1-4Glcß1-1'Cer, Glcß1-6Glcß1-1'Cer şi Galß1-4Glcß1-1'Cer. Kubo şi colab., şi-au pus întrebarea dacă nu cumva diferenţele structurale ale GSL ar putea fi corelate cu diferenţele morfologice în dezvoltarea embrionară, de ex., la *A. crasisspina* şi *H. pulcherrimus*.

În general s-a observat că BCL sunt amestecuri de fitosfingozină cu catenă liniară şi ramificată, iar AG sunt amestecuri de acizi cu catenă normală (C16-C20) şi 2-hidroxi-AG. Irie şi colab., (1990) au relatat recent că Glcß1-1'Cer izolat din spermatozoizii de stea de mare, *A. amurensis*, conţine 17,4% (4E, 8E, 10E)-2-amino-4, 8, 10-octadecatrien-1,3-diol (d18:3) şi 53,7% dintr-o BCL nouă, (4E, 8E, 10E)2-amino-9-metil-4, 8, 10-nonadeca-trien-1, 3-diol (d20:3).

O serie de gangliozide găsite la echinoderme sunt prezente în Tabelul 57.

Tabelul 57. Gangliozide găsite în echinoderme.

Structură	Sursă
Steaua de mare	
Araß1-6Galß1-4NeuGc8Me2-3Galß1-4Glcß1-Cer	*Asterina pectinifera*
Araß1-6Galß1-4NeuGc2-3Galß1-4Glcß1-Cer	*A. pectinifera*
$Ara_{f,p}$1-6Galß1-4 \ NeuGc2-3Galß1-4Glcß1-Cer / Galß1-8	*A. pectinifera*
Ara_f1-3Galα1-6 \ Galß1-4NeuGc2-3Galß1-4Glcß1-Cer / Ara_f1-3	*A. pectinifera*
Ara_f1-3Galα1-4NeuGc8Me2-3Gal1-3Gal1-4NeuAc2-3Galß1-4Glcß1-Cer	*A. pectinifera*
NeuAcα2-9NeuAcα2-3GalNAcß1-3Galß1-4Glcß1-Cer	*Euasterias retifera*
NeuGc8Me2-3 \ GalNAcß1-3Galß1-4Glcß1-Cer / NeuGc8Me2-6	*Asterias amurensis* (hepatopancreas)
NeuGc8Me2-3Galß1-4Glcß1-Cer	*Aphelasterias japonica*
N-[*O*-NeuGc8Meα]-glycolyl-Sia8Meα2-3Galß1-4Glcß1-Cer	*A. japonica*
Arici de mare	
NeuAcα2-6Glc-Cer	*Anthocidaris crassispina*, sperma
NeuAcα2-8NeuAcα2-6Glc-Cer	*A. crassispina*, sperma
NeuGcα2-6Glcß1-Cer	*A. crassispina* (ouă)
HSO_3-8NeuGcα2-6Glcß1-Cer	*A. crassispina* (ouă) *Echinocardium cordatum* (gonade)
NeuGcα2-6Glc1-8NeuGc2-6Glc-Cer	*Strongylocentrotus intermedius* (ouă, embrion)
HSO_3-8NeuGcα2-6Glc1-8NeuGc2-6Glc-Cer	*S. intermedius* (ouă, embrioni)

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

4.2.5. Glicolipide din microorganisme

Din microorganisme au fost izolate atât glicosfingolipide cât şi glicogliceroli pide.

4.2.5.1. Glicogliceroli pide din microorganisme

Din *Pseudomonas rubescens* au fost izolate şi caracterizate două monohexozil-digliceride, compusul I şi compusul II. Compusul I dădea, la CSS în sisteme de solvenţi acide, neutre şi bazice, spoturi rotunde. Compusul II avea tendinţa de a migra ca bandă în sistemul neutru de solventi, cauza fiind caracterul acid al compusului; după cum era de aşteptat, această comportare cromatografică era suprimată în sisteme acide sau bazice de solvenţi. Natura acidă a compusului II a fost confirmată prin cromatografie pe DEAE-celuloză: compusul i a fost luate cu cloroform-metanol în vreme ce compusul II a fost eluat numai cu amestec de cloroform, metanol şi acetat de amoniu. Metanoliza alcalină a glicolipidului I a eliberat toată glucoza ca glicozid acvosolubil. Cromatografia pe hârtie şi hidroliza acidă a glicozidului acvosolubil au indicat că acesta era sn-3-O-glucozil-glicerol; raportul molar glucoză:glicerol era de 1:1. În urma hidrolizei acide a glicozidului acvosolubil, a fost găsită o singură hexoză, D-glucoza, prin utilizarea reactivilor Glucostat. S-a găsit, prin oxidare cu periodat, că glicozidul I intact este un derivat al sn-3-(glucopiranozil)glicerolului; prin reacţia periodat-Schiff a fost exclusă structura 2-O-glucofuranozil-glicerol. S-a dedus din toate aceste rezultate că compusul I este 1,2-diacil-sn-3-(ß-D-glucopiranozil)glicerol.

Glicozidul acvosolubil provenit prin metanoliza alcalină a compusului II era sn-3-glucuronosil-glicerol. Oxidarea cu periodat, reacţia periodat-Schiff, analiza cromatografică, etc., au demonstrat că compusul II este 1,2-diacil-sn-3(ß-D-glucuronosil p)glicerol (S. G. Wilkinson, 1968).

Din mai multe specii ale genului *Saccharopolyspora* (*S. hirsuta*, *S. rectivirgula*, *S. erythraea*), a fost izolat un glicolipid pe bază de glicerol: Manα1-3(heptadecanoil-6)Manα1-1(heptadecanoil-3)glicerol. De fapt, acizii graşi prezenţi sunt următorii: anteizo-heptadecanoic, izo-17:0, izo-16:0, izo-18:0. Cele două grupări O-acil gras au fost identificate, între altele, prin hidroliza alcalină selectivă, care duce la fracţiunea oligozaharidică şi AG. Oligozaharidul a fost metilat prin metoda lui Hakomori (1964), purificat, hidrolizat cu acid formic şi acid sulfuric, supus reacţiei de reducere cu borohidrură de sodiu deuterată şi peracetilare. Analiza prin CGL-SM a dus la următorii derivaţi, în proporţii echimoleculare: 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-manitol şi 1,3,5 tri-O-acetil-2,4,6-tri-O-metil-manitol, ceea ce este în acord cu prezenţa unui rest Man terminal şi a unui rest Man O-3-substituit. Poziţia de O-acilare a glucidului a fost stabilită prin analiza de metilare astfel: glicolipidul a fost solubilizat în trimetil fosfat, tratat cu 2,6-di-(tert-butil)piridină şi trifluorometansulfonat de metil, metilat din nou prin metoda lui Hakomori cu iodura de metil deuterată, hidrolizat, redus cu borohidrură de sodiu deuterată, acetilat şi analizat cu sistemul CGL-SM. Prin această metilare a glicolipidului nativ, AG nu este clivat iar gruparea deuterometil este încorporată la C-6 a Man interne, după cum rezultă din identificarea, prin CGL-SM, a 1,3,5-tri-O-acetil-6-O-deuterometil-2,4-di-O-metil-manitolului. Configuraţia glucidelor din constituţia glicolipidului a fost studiată prin tratare cu hexokinază şi ATP, urmat de dozarea manozo-fosfatului: a rezultat că manoza are configuraţia D. Anomeria a fost determinată prin tratarea fracţiunii oligozaharidice cu α-manozidază: a rezultat manoză şi glicerol, prin urmare ambele legături glicozidice sunt α. Spectrele RMN protonice ale glicolipidelor de la *S. hirsuta*, *S. rectivirgula*, *S. erythraea* sunt extrem de asemănătoare. Deasemenea deplasările chimice ale semnalelor în spectrele RMN ^{13}C sunt similare. Au fost observate anumite diferenţe de intensitate în regiunile *upfield* care conţin semnalele catenelor acil gras, atât la spectrele ^{1}H cât şi ^{13}C. Diferenţele respective sunt în bun acord cu rezultatele SM-BAR şi reflectă variaţia AG din

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

compuşii respectivi. În spectrele RMN ^{13}C ale glicolipidelor sunt vizibile două semnale ale atomilor de carbon anomeri la 102,4 ppm şi 101,2 ppm, precum şi 13 rezonante foarte clare între 60 şi 80 ppm pentru ceilalţi atomi de carbon ai celor două resturi Man şi pentru glicerol. În partea *high-field* a spectrului (18-40 ppm), au fost observate semnalele tipice pentru catenele de acil gras, inclusiv cele foarte caracteristice pentru catenele izo şi anteizo (Tabelul 58). Spectrul RMN ^{1}H arată deasemenea două semnale de intensitate egală la 5,09 şi 4,78 ppm care au fost atribuite protonilor anomeri cu constantele de cuplare $J_{1,2}$ 1,9 Hz şi $J_{1,2}$ 1,8 Hz tipice pentru două resturi de Man. Deplasările chimice RMN ^{13}C pentru C-5 şi C-6 indică o substituţie la C-6 ε Man interne. Glicerolul prezintă un semnal al grupării CH la 4,0 ppm, deplasat up-field cu 1 ppm în comparaţie cu glicolipidele tipice în care gruparea CHOH este substituită, ceea ce demonstrează prezenţa unei grupări hidroxil libere la C-2. Spectrul RMN ^{1}H COSY în dimetil sulfoxid a arătat că ambele grupări hidroxil de la grupările metilenice ale glicerolului sunt substituite în timp ce gruparea hidroxil metinică este liberă. Deplasările chimice din spectrul RMN ^{13}C a glicerolului constituie o dovadă suplimentară că gruparea hidroxil din poziţia 2 a glicerolului este liberă (A. Gamian şi colab., 1996).

Tabelul 58. Date spectroscopice RMN ^{1}H şi ^{13}C pentru glicolipidul de la *S. rectivirgula*.

	Deplasari chimice ale fragmentelor (ppm)			
	Manα1-	3Manα	Gro*	Acil gras
Proton				
1	5,09 ($J_{1,2}$ 1,9)	4,78 ($J_{1,2}$ 1,8)		
2	3,98 ($J_{1,2}$ 1,8; $J_{2,3}$ 3,4)	4,07 ($J_{1,2}$ 1,8; $J_{2,3}$ 3,4)		
3	3,80 ($J_{2,3}$ 3,4; $J_{3,4}$ 9,5)	3,85 ($J_{2,3}$ 3,3; $J_{3,4}$ 9,3)		
4	3,59 ($J_{3,4}$ 9,3; $J_{4,5}$ 9,5)	3,75		
5	3,77	3,76		
6	3,88 ($J_{5,6}$ 1,8; $J_{6,6'}$-11,4)	4,40 ($J_{5,6}$ 1,2; $J_{6,6'}$-11,7)		
6'	3,72 ($J_{5,6'}$ 6,1; $J_{6,6'}$-11,2)	4,31 ($J_{5,6'}$ 6,1; $J_{6,6'}$-11,7)		
1			4,15 ($J_{1,2}$ 4,8; $J_{1,1'}$ 11,4)	
1'			4,13 ($J_{1',2}$ 5,8)	
2			4,00 ($J_{1',2}$ 5,8)	
3			3,45 ($J_{2,3}$ 6,7; $J_{3,3'}$-10,4)	
3'			3,78 ($J_{2,3'}$ 4,4)	
CH_3				0,86
CH_2				1,27
				1,63 (3-CH_2)
				2,36 (2-CH_2)

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Carbon				
1	102,43	101,23		
2	70,84	69,94		
3	71,37	79,08		
4	67,96	66,66		
5	73,67	71,48		
6	62,13	64,18		
1			65,41	
2			68,44	
3			69,24	
CH_3				11,46 (*ai*)
				19,25 (*ai*)
				22,67(i)
CH_2				34,35 (C(2))
				25,14(C(3))
				36,89(*ai*)
				39,32(*i*)
				27,34 (*ai*)
				27,66 (*l*)
				29,42-30,26
CH				28,21 (*i*)
				34,68 (*ai*)

* Gro, glicerol

Structura glicolipidului este indicată în Fig 28.

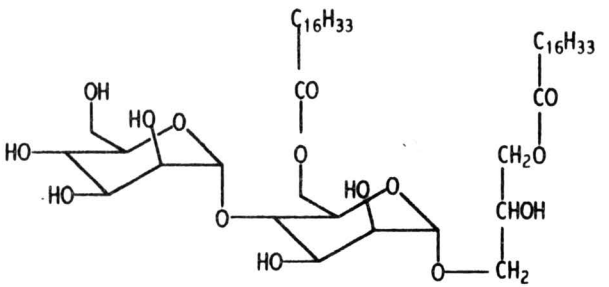


Fig. 28.Structura glicolipidului major din microorganismele genului *Saccharopolyspora*.

Acidul sialic KDO (acid 3-deoxi-D-mano-octulosonic) a fost găsit în lipopolizaharidul de serogrup 1 de la *Legionella pneumophila* (H. Moll şi colab., 1997). Din lipopolizaharidul respectiv a fost clivat un dizaharid al cărui spectru a fost atribuit utilizând un experiment COSY iar sistemele spin pentru Manp şi KDOp au fost identificate prin intermediul constantelor de cuplare (Tabelul 59). Deplasările chimice pentru Man în cadrul dizaharidului sunt foarte apropiate de cele ale α-D-manopiranozei şi diferite de deplasările chimice ale anomerului ß corespunzător: deplasările chimice pentru H-3 şi H-5 a Man din dizaharid sunt la δ 3,84 şi 3,70;

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

pentru α-manopiranoză valorile corespunzătoare sunt 3,86 şi 3,82; pentru ß-manopiranoză valorile δ sunt 3,66 şi, respectiv, 3,38. Comparaţii similare ale deplasărilor chimice şi constantelor de cuplare au dus la concluzia că KDO, în cadrul dizaharidului, este în forma α-piranozică: δ pentru H-3ax şi H-3eq ale KDO din dizaharid au valorile 1,93 şi, respectiv, 2,05; Valorile δ corespunzătoare în acidul 3-deoxi-α-D-mano-octulopiranozic sunt 1,88 şi, respectiv, 1,99; cele două forme furanozice au valorile δ 2,08, 2,30, 2,38 şi 2,60. Spectrele RMN ^{13}C au confirmat rezultatele de mai sus. Datele RMN ^{1}H pentru un dizaharid conţinând KDO sunt în Tabelul 59 iar structura este prezentată în Fig 29.

Tabelul 59.Date RMN ^{1}H pentru un dizaharid conţinând Man şi KDO.

Restul glucidic	Proton							
	H-1	H-2	H-3eq H-3ax	H-4	H-5	H-6a H-6b	H-7	H-8a H-8b
Manα1-	4,86	3,97	3,84	3,64	3,70	3,84 3,71		
	$J_{1,2}$ 1,8	$J_{2,3}$ 3,5	$J_{3,4}$ 9,6	$J_{4,5}$ 10	$J_{5,6a}$ 2,7	$J_{5,6b}$ 5 $J_{6a,6b}$ 11		
-8KDO	1,93	4,09	4,05 2,05	3,93	4,03			3,82 3,65
			$J_{3eq,4}$ 5 $J_{3eq,3ax}$ 12,7	$J_{3ax,4}$ 12	$J_{4,5}$ 3,0	$J_{5,6}$ 0,9	$J_{6,7}$ 9,5 $J_{7,8a}$ 4,5	$J_{7,8b}$ 2,5 $J_{8a,8b}$ 11

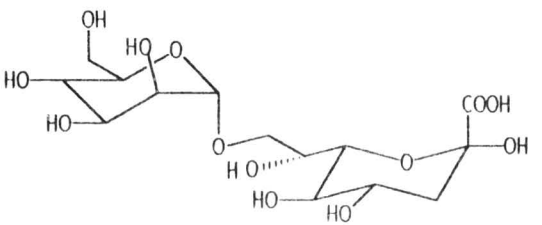


Fig. 29.Structura dizaharidului din lipopolizaharidul de serogrup 1 din *L. pneumophila*

5. Agregarea gangliozidelor în soluţii apoase

Proprietăţile micelare ale gangliozidului GM1 au fost studiate printr-o serie de metode ca: gel-filtrare, dializă la echilibru, centrifugare în gradient de sucroză (S. Formisano şi colab., 1979).

Gangliozidele GM4, GM2, GM1, în mediu apos, sedimentează la ultracentrifugare ca agregate oligomere independente având concentraţia între 10^{-3} M şi 10^{-9} M şi constantele de sedimentare $s_{20,w}$ de 5,3, 7,5 şi, respectiv, 10,0. Dacă gangliozidele dizolvate în dimetil sulfoxid erau diluate cu apă, agregatele obţinute aveau coeficienţi de sedimentare mai mici În prezenţa tetrametil ureii nu s-a observat nici o sedimentare la ultracentrifugare. Un analog gangliozidic, având două catene hidrocarbonate în locul fracţiunii ceramidice, s-a comportat la sedimentare

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

asemănător cu gangliozidul GM1. Dar un analog cu o singură catenă alifatică hidrocarbonată a format agregate de sedimentare numai la concentrații mai mari de 10^{-3} M (W. Mraz și colab., 1980).

Concentrația micelară variază cu natura chimică a gangliozidului și chiar cu metoda utilizată (Tabelul 60).

Tabelul 60. Valori ale concentrației micelare a gangliozidelor.

Concentratia (M)	Gangliozid	Tehnica utilizată
1×10^{-4}	amestec	Măsurarea tensiunii superficiale
1×10^{-5}	amestec	Măsurări de conductanță
1×10^{-4}	GM1	Acțiunea neuraminidazei
$7,5 \times 10^{-5}$	GM2	Metoda cu triiodură
$8,5 \times 10^{-5}$	GM1	Metoda cu triiodură
$9,5 \times 10^{-5}$	GD1a	Metoda cu triiodură
1×10^{-4}	GT1b	Metoda cu triiodură

Banda amido I a sfingolipidelor prezintă modele complicate datorită interacțiilor intra- și intermoleculare ce se realizează prin intermediul legăturilor de hidrogen. Pentru a atribui benzile de absorbție amido I ale gangliozidului GM1 diferitelor grupări amidice din capătul polar și fracțiunea hidrofobă, au fost utilizați ca sisteme de referință următorii compuși: GalNAc, NANA, GlcCer, ceramid cu AGN. Benzile de frecvență ale COOH și COO^- din AS al lui GM1 au fost determinate prin pH-titrare și s-a găsit că absorb la 1729 cm^{-1} și, respectiv, 1605 cm^{-1}. În D_2O cele trei grupări amidice ale gangliozidului GM1 dădeau o bandă de absorbție largă la 1627 cm^{-1} în timp ce la GlcCer, interacțiile intra- și intermoleculare ale grupării amido dau naștere la trei benzi tip I distincte. Astfel de date au fost utilizate pentru studiul asocierii lipidice (E. Mueller și A. Blume, 1993).

O proprietate importantă a gangliozidelor este caracterul lor amfifilic pronunțat derivând din prezența în molecula lor a unui fragment voluminos hidrofil, încărcat (catenă oligozaharidică) și a unui fragment hidrofob dublu catenar (ceramidul). Acest fapt determină gangliozidele să se agrege în soluții apoase, peste o anumită concentrație (S. Formisano și colab., 1979). Conformația agregatelor este determinată în principal de constrângerile geometrice ale monomerilor în interiorul agregatului, care este corelată cu proprietățile geometrice sau extensia moleculei amfifile. Sunt disponibile multe date privind proprietățile de agregare ale gangliozidelor majore din sistemul nervos cum ar fi GM2, GM1a, GD1a, și GT1b (H. Rauvala, 1979) care sunt prezenți în soluție sub formă de micele non-sferice.

Lucrări anterioare au arătat că prin reducerea lungimii catenei oligozaharidice în secvența gagliozidelor GT1b, GD1a, GM1a, GM2, toate conținând același fragment ceramidic, s-a realizat tranziția de la agregate micelare la structuri bistratificate.

Gangliozidul GM3 este prezent în sistemul nervos în cantități mici dar este larg distribuit în organismele animale iar porțiunea sa lipidică este adesea caracterizată de un înalt grad de eterogenitate (catene acil lungi, nesaturate și hidroxilate). GM3 este caracterizat printr-o catenă oligozaharidică scurtă dar suficientă pentru a-i conferi caracter amfifil acestei molecule, cu toate că prezintă un înalt caracter hidrofob. S-a preparat gangliozidul GM3 de înaltă puritate conținând o porțiune ceramidică similară cu gangliozidele menționate mai sus și s-au studiat particularitățile de agregare în soluție apoasă. Rezultatele experimentale arată că GM3 formează spontan vezicule unilamelare în loc de micele globulare cum este cazul gangliozidelor dotate cu catene oligozaharidice mai lungi.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Prezența agregatelor GM3 în soluție, raza lor hidrodinamică, masa moleculară și conformația au fost determinate prin analiza împrăștierii statice și dinamice a luminii laser. În esență, aparatul include un laser cu ioni de argon, o celulă termostatată și un corelator digital. Intensitatea relativă normalizată I_r a luminii împrăștiate de către o soluție diluată de particule cu masa moleculară medie M este dată de relația:

$$I_r = (I_S - I_W)(I_W)^{-1}$$

unde I_S și I_W sunt lumina împrăștiată de soluție și respectiv de către apă pură.

I_r este dată de relația:

$$I_r = A \times (dn/dc)^2 \times c \times M \times P(\theta)$$

unde c este concentrația particulelor în g/ml; dn/dc este incrementul indicelui de refracție a particulelor suspendate; A, egal cu 5,85 g/ml, este o constantă instrumentală iar $P(\theta)$ este factorul dependent de forma particulelor, care este egal cu unu pentru particule mult mai mici decât lungimea de undă a luminii. Precizia în determinarea masei moleculare este de ordinul 10%.

Măsurătorile de împrăștiere dinamică a luminii dau coeficientul de difuzie translațional al particulelor. Mișcarea browniană a particulelor dă naștere de fapt la fluctuații temporale a luminii împrăștiate care pot fi analizate cu ajutorul tehnicilor de corelare pentru a obține evaluarea precisă a coeficientului de difuzie D și a indicelui de polidispersie σ. Raza hidrodinamică este calculată din valoarea lui D cu ajutorul relației Stokes-Eistein:

$$D = k_B \times T \times (6 \times \pi \times \eta \times R)^{-1}$$

unde k_B este constanta lui Boltzmann, T este temperatura absolută iar η este vâscozitatea solventului. Determinarea lui D este absolută și nu este afectată de incertitudini ale parametrilor auxiliari (ca de ex. dn/dc pentru măsurători de intensitate) deoarece D depinde numai de unghiul de împrăștiere θ și de lungimea de undă a luminii laser, ambele fiind cunoscute. Pentru soluții diluate, ca de ex. cele folosite în experimentul lui Sonnino et al (1990), D este deasemenea indepedent de concentrația c.

Măsurătorile au fost realizate la 37 °C pe soluții GM3 3×10^{-4} și NaCl 3×10^{-2} M, după 24 h de echilibrare la temperatura camerei. Stabilitatea agregatelor de GM3 funcție de concentrația gangliozidului a fost măsurată pe soluția de mai sus după diluare . Soluțiile au fost turnate într-o celulă de dispersie printr-un filtru policarbonat cu mărimea porilor de 0,4μm. Filtrarea este necesară pentru a elimina praful de silicagel care ar interfera în măsurători. Agregatele de GM3 nu au fost reținute de către filtru, după cum a rezultat din determinările de radioactivitate ale filtrului după filtrare.

O recunoaștere directă a agregatelor a fost obținută prin microscopie electronică după înghețarea rapidă a soluției GM3 10^{-4} M în NaCl 30 nM, urmând indicațiile din literatură.

Măsurători de dispersie a luminii laser efectuate pe diferite probe de GM3, la o concentrație de 3×10^{-4} M, dădea o masă moleculară pentru agregatele GM3 între 15.000 și 30.000 kDa. Aceste valori corespund unei raze hidrodinamice R între 350 și 470 Å.

Microscopia electronică a unei soluții de GM3 10^{-4} M prezintă structuri sferice bistratificate cu diametrul între 700 și 1.000 Å.

S-a arătat (L. Cantu si colab., 1986) că GT1b, GD1a, GM1a și GM2 formează, la dizolvare în apă, micele cu mărimea crescătoare chiar în această ordine. Dependența pronunțată a numărului de agregare micelar de catena oligozaharidică a fost explicată în termeni de împachetare geometrică a moleculelor individuale în micele. Pentru un volum hidrofob și o lungime date, cu cât capul polar este mai mic cu atât mai mică este curbura posibilă a agregatului și cu atât mai mare este numărul de agregare. S-a arătat că în secvența de mai sus a ganglozidelor

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

parametrul de împachetare P, care descrie constrângerile de împachetare geometrice, este dat de relaţia:

$$P = v \times (a_o \times l_c)^{-1}$$

unde v este volumul hidrofob, a_o este suprafaţa capului polar iar l_c lungimea catenei hidrofobe; pentru gangliozidele de mai sus P se situează între 0,4 şi 0,45.

Valoarea 0,5 este parametrul de împachetare teoretic la care agregatele suferă tranziţia de la micele globulare la agregate bistratificate. S-a arătat că GM2 are un parametru de împachetare de 0,45. Prin urmare o valoare de 0,5 pentru GM3 este cât se poate de rezonabilă, acesta având un cap polar mai puţin voluminos. Comparaţia are în vedere faptul că fragmentul ceramidic al gangliozidelor este în esenţă identic.

6. Activitatea biologică a glicolipidelor

Activitatea biologică a glicolipidelor a fost studiată îndeosebi pe populaţii de celule dar, într-o măsură mai redusă şi pe organisme întregi, chiar pe subiecţi umani.

6.1. Glicosfingolipidele ca modulatori pentru semnalizarea transmembranară şi mediatori pentru interacţii celulare

Glicosfingolipidele , sau cataboliţii lor modificaţi, modulează la suprafaţa celulară transducţia semnalului transmembranar prin influenţarea protein kinazelor asociate cu receptorii factorilor de creştere şi a protein kinazei C. Pe de altă parte, acelaşi GSL sau GSL diferite interacţionează într-o manieră de înaltă specifitate, cu alte GSL sau cu proteine de legătură, la suprafaţa celulelor adiacente sau în matricea extracelulară. Interacţia GSL-GSL furnizează baza sistemului de recunoaştere celular specific, independent de sistemele fibronectină/integrină sau sistemele lectinelor de suprafaţă, care au loc anterior în cursul unui eveniment de recunoaştere celulară (Y. A. Hannun şi R. M. Bell, 1989).

6.1.1. Reglarea proliferării celulare şi inducerea diferenţierii de către gangliozide

Conceptul că gangliozidele membranare pot regla creşterea celulară s-a dezvoltat în timpul ultimelor două decade şi s-a bazat iniţial pe schimbările în sinteza GSL asociate cu transformarea oncogenă, ciclul celular şi ''inhibiţia de contact'' a creşterii celulare. Câteva linii de studiu asupra GSL ca reglatori de creştere celulari sunt prezentate în Tabelul 61.

Tabelul 61.Activităţi biologice ale glicosfingolipidelor.

Antigeni tumorali:
- Expresia GM2 pe celule melanoma umane
- Expresia GD2 pe melanoma în curs
- Anticorpii anti-GD3 au activitate antitumorală
- Glicolipidul TerC ca marker pentru teratocarcinomă
- LacCer ca marker al cancerului de colon
- Un gangliozid ca marker pentru leucemia mielogenă cronică
- Alterarea glicolipidelor în celulele NIH-3T3 *ras*-transfectate
- GD1a exprimat de către celulele hepatoma de şobolan

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Markeri ai diferenţierii celulare:
- Creşterea concentraţiei GM3 în celulele diferenţiate HL-60 şi U937; turnover-ul resturilor de AS în timpul creşterii fibroblaştilor
- Glicolipidul SSEA-1 din dezvoltarea embrionară
- Creşterea concentraţiei GM1 şi GD1a în cursul diferenţierii teratocarcinomei
- Creşterea concentraţiei GM3 în cursul diferenţierii epiteliului intestinal
- Antigenul I în diferenţierea eritrocitelor
- Creşterea concentraţiei GD3 în diferenţierea celulelor musculare
- Creşterea concentraţiei gangliozidelor în neuroblastomă
- Creşterea concentraţiei GM1 în cursul diferenţierii celulelor limfoide

Rol în fluiditatea membranei:
- Prezenţa gangliozidelor pe foiţa externă a bistratului conferă rigiditate

Modularea proliferării celulare:
- Activitate de tip factor de creştere al nervilor la gangliozidul GQ1b
- Activităţi neuritogenice şi neuronotrofice ale gangliozidelor
- Inhibiţia de către gangliozidul GM1 a creşterii celulelor Swiss 3T3
- Inhibiţia de către gangliozidul GM3 a mitogenezei induse de către factorul de creştere
- Inhibiţia proliferării limfocitelor
- Stimularea proliferării astrogliale şi neuroblastoma de către gangliozidele exogene

Modularea fosforilării proteinelor:
- Activitate protein kinazică dependentă de GQ1b
- Gangliozidele inhibă protein kinaza din creier de porc
- GM3 inhibă fosforilarea EGF-dependentă a tirozinei receptorului EGF
- Gangliozidele induc fosforilarea proteinelor mielinice
- Inhibiţia protein kinazei C de către gangliozidele GT1b şi GD1a
- Protein kinaza dependentă de gangliozide şi de ionii de calciu
- GM3 inhibă fosforilarea tirozinei receptorului factorului de creştere derivat din plachete de-N-acetil GM3 stimulează tirozin kinaza receptorului EGF

Răspunsul de contact celular:
- Inhibiţia de contact celular
- Modularea de către globozid a formării joncţiunii neuromusculare
- GM2 modulează adezivitatea retinală
- Inducţia GD1b şi GT1b în timpul interacţiei neurogliale

Gangliozidele ca receptori şi cofactori ai receptorilor:
- Medierea efectului mitogenic de către complexul GM1-subunitatea B a toxinei holerei
- Gangliozidele seriei b ca receptori pentru tetanotoxină
- Legarea gangliozidelor la fibronectină
- Legarea lamininei, trombospondinei şi factorului von Willebrand la glicolipidele sulfatate

Procesul de recunoaştere în imunitate:
- Antigeni de grup sanguin
- Antigeni autoimuni
- Antigeni tumorali
- Antigeni în diferenţiere

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

- Markeri limfocitari

Acţiuni variate:
- Inversia embrionului de către un glicolipid complex
- Cerebrozide cu activitate antiulcerogenică
- Cerebrozide din plante stimulează diviziunea *Schizophylium commune*
- Modularea transportului sodiului de către gangliozide complexe
- "Sindromul gangliozidic" la iepuri imunizaţi intens cu GM1 şi GD1a
- Modificarea glicolipidelor în funcţie de ciclul celular

GSL sunt molecule amfipatice deci sunt capabile de a fi încorporate în membrana celulară când sunt adăugate exogen; în acest mod celulele dobândesc antigenicitate nouă şi capacitatea de a influenţa creşterea. Această abordare a fost utilizată extensiv pentru a identifica funcţia GSL specifice, după cum se arată în Tabelul 62. Administrarea anumitor gangliozide găsite din abundenţă în celule diferenţiate induce diferenţierea terminală. De ex. celulele HL60 incubate cu gangliozidul GM3 se diferenţiază în monocite/macrofage (caracterizate prin nivele înalte ale gangliozidului GM3), în timp ce aceleaşi celule incubate cu sialilparaglobozid (SPG) se diferenţiază în granulocite care au un nivel ridicat de SPG, adică (i) îmbogăţirea în gangliozide specifice declanşează şi defineşte direcţia diferenţierii terminale şi (ii) nivele crescute ale gangliozidelor în membrană sunt rezultatul precum şi cauza diferenţierii. Formarea neuritelor (neuritogeneza), un fenotip de diferenţiere tipic al celulelor neuronale, poate fi indus de către gangliozide, uneori la concentraţii foarte joase (gangliozidul GQ1b la 2-5 nM), sau conjugate sintetice acid sialic-lipide (J. Ito şi colab., 1989). Acest efect poate fi atribuit creşterii, la suprafaţa celulară, a protein kinazei sensibile la GQ1b. Efectul gangliozidelor exogene asupra răspunsului imun al celulelor B şi T a trezit mult interes şi controversă. Gangliozidele dispersate din celulele tumorale au fost implicate în suprimarea răspunsului imun al gazdei (S. Ladisch şi colab., 1987). În timp ce exprimarea markerului celular CD4 al auxiliarului T este inhibată reversibil de gangliozide in vitro, gangliozidele sunt ineficace în modularea răspunsului umoral precum şi celular imun.

Modul cum schimbări în cantitatea şi organizarea GSL în membrană determină transducţia semnalului rămâne total necunoscut. Modularea creşterii celulare poate acţiona printr-o schimbare a influxului de Ca^{2+}, printr-o schimbare de pH intracelular printr-un antitransportor Na^+/H^+, sau printr-o transducţie de semnal modificat prin intermediul unei kinaze asociate receptorului sau transductorului, după cum se va vedea în continuare.

O nouă abordare, contrară îmbogăţirii în GSL, este modularea GSL prin inhibiţia sintezei lor utilizând analogul PDMP al ceramidului, în particular izomerul D-treo, care inhibă UDP-Glc: ceramid Glc-transferaza şi reduce puternic sinteza tuturor GSL provenite de la GlcCer (B. Felding-Habermann şi colab., 1990). Cu toate acestea reactivul respectiv induce deasemenea acumulări de ceramide şi măreşte sinteza de N, N-dimetil-D-eritro-sfingenină (DMS). Efectul modulator de creştere al D-PDMP în celulele CTLL dependente de interleukina 2 şi în celulele A431 dependente de EGF este datorat unui nivel crescut al DMS precum şi unui nivel scăzut al gangliozidului GM3 (Tabelul 62).

Tabelul 62. Efectele gangliozidelor şi produşilor lor de degradare asupra reglării creşterii celulare şi diferenţierii celulare.

A. Linii de investigare a creşterii celulare gangliozid-dependente

1. Efectul butiratului, retinoizilor şi TPA asupra sintezei gangliozidelor şi creşterii celulare.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

2.Efectul liganzilor gangliozid-specifici asupra creşterii celulare.
3.Efectul gangliozid-sialidazei legate de membrană şi a inhibitorilor sialidazei asupra creşterii celulare mediate de gangliozide.
4.Efectul adăugarii exogene de glicolipide asupra creşterii şi diferenţierii celulare.
5.Efectul inhibiţiei sintezei totale a GSL şi a sintezei crescute de DMS de către D-treo-izomerul analogului ceramidului, PDMP.

B.Gangliozidele şi produşii lor de degradare ca modulatori ai semnalului transmembranar*.

1.PK-C: polisialogangliozidele (HL60 PK-C ↓)*; lizogangliozid (PK-C din creier ↓); lizo-GM3 (A431 PK-C ↓); sfingozina (PK-C din creier ↓); lizo-GM3 (A431 PK-C ↓); sfingozina (PK-C din creier ↓); DMS (A431 PK-C ↓).
2. Kinaza receptorului factorului de creştere (efectul asupra autofosforilării): GM1 (PDGF-R ↓); GM3 (EGF-R ↓); lizo-GM3 (EGF-R ↓); DMS (EGF-R ↑); 2,3-SPG (insulin-R ↓).

C. Efectul asupra altor proteine funcţionale

1. Alte protein kinaze: GD1a (Ca^{2+}/CaM-dependent-kinaza ↑): GQ1b ((Ca^{2+}/kinaza suprafeţei celulare ↑); PKJ kinaza din creier, polisialogangliozid dependentă ↑); (PKL kinaza din creier ↓)
2.Modularea transportului ionic: GM1 (transportul Na^{+})

2.Receptori ß-adrenergici: gangliozide necunoscute.

*Săgeata ↓ indica inhibiţia; săgeata ↑ indică stimularea

Modularea creşterii celulare dependentă de gangliozide prin transducţia semnalului modificat. Protein kinazele asociate receptorului factorului de creştere, PK-C, şi familia de proteine G (ras, G_s, G_i, G_o, etc) sunt trei sisteme majore de semnalizare transmembranară care operează în majoritatea celulelor eucariote. Primele două mecanisme s-au arătat a fi modulate de către gangliozide sau produşii lor metabolici, îndeosebi lizo-GM3, de-N-acetil-GM3, sfingozina şi N,N-dimetil sfingozina (Tabelul 62). Modularea celui de-al treilea sistem (familia de proteine G) este neexplorată.

Creşterea celulelor 3T3 este foarte dependentă de factorul de creştere derivat din plachete, iar tirozin-kinaza asociată receptorului este inhibată de către gangliozidele GM1 şi GM3 dar nu de către alte gangliozide. În mod similar activitatea tirozin-kinazei asociate receptorului EGF este inhibată specific de către gangliozidul GM3 dar nu de către GM1 sau alte gangliozide (E. Bremer şi colab., 1986). Imunoprecipitarea receptorului EGF de către anticorpul monoclonal al său coprecipită GM3 şi receptorul EGF, iar GM3 previne dimerizarea EGF-dependentă a receptorului. Dimerizarea sau oligomerizarea receptorului se consideră a fi o condiţie prealabilă pentru activarea tirozin kinazei, şi inhibiţia sa de către gangliozidul GM3 poate fi corelată cu inhibiţia GM3-dependentă a kinazei receptorului, îndeosebi în prezenţa lizo-PC (Y. Igarashi şi colab., 1990). Cu toate că răspunsul de creştere EGF-dependent al celulelor (de exemplu A431), care conţin un nivel ridicat de receptori EGF, este mai complex, rolul GM3 în reglarea funcţiei receptorului EGF a devenit tot mai clar printr-un studiu pe mutante ale celulelor A431.

Creşterea celulară dependentă de insulină precum şi activitatea tirozin kinazei asociată receptorilor insulinei este inhibată specific de către 2,3-SPG, într-o măsură mai mică de către GM3, şi nu de către alte gangliozide. Pe de altă parte activitatea PK-C este puternic inhibată de

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

către gangliozidele GD1b, GT1b, şi puţin de către gangliozidele GM1 şi GM3, când activitatea este determinată prin metoda lipozomilor în absenţa detergentului. Cu toate acestea un astfel de efect nu a fost observat în condiţii de micele mixte, adică concentraţie înaltă de detergent.

Lizo-GM3 prezintă un efect inhibitor puternic asupra PK-C şi totodată lizo-GM3 a fost găsit în celule A431. Această constatare sugerează o nouă cale catabolică pentru GSL şi un rol important al cataboliţilor gangliozidelor în modularea creşterii celulare. Un alt catabolit, de-N-acetil-GM3, (identificat cu ajutorul anticorpului monoclonal specific DH5) a fost detectat în celule A431 şi deasemenea în câteva alte celule transformate. În contrast cu efectul inhibitor al GM3 şi lizo-GM3, de-N-acetil-GM3 stimulează activitatea tirozin kinazică asociată receptorului EGF. Adăugarea exogenă de de-N-acetil-GM3 stimulează creşterea celulelor în care de-N-acetil-GM3 endogen nu este prezent în cantităţi detectabile (de ex. celulele 3T3) (N. Hanai şi colab., 1988).

Efectele sfingozinei şi N,N-dimetil sfingozinei asupra transductorilor de semnal transmembranari sunt independente de efectele gangliozidelor şi lizo-GM3. Ca o contrapondere la efectul stimulator al 1,2-diacilglicerolului asupra PK-C, a fost propus un efect inhibitor al sfingozinei de către Bell, Hannun şi colab., (1989). Pornind de la aceasta au fost întreprinse numeroase studii privind efectul sfingozinei asupra a diferite procese celulare ca de ex. agregarea plachetelor, răspunsul neutrofilelor, diferenţierea celulelor HL60 TPA-dependente, embriogeneza şi acţiunea de promotor antitumoral. Există în aceste chestiuni anumite discrepanţe şi semne de întrebare. (i) Sfingozina prezintă un efect evident asupra multor procese celulare şi are efect asupra activităţii PK-C la concentraţii înalte (50-100 μM), cu toate că este dificil de afirmat dacă efectul este farmacologic sau fiziologic.

Cantitatea reală de sfingozină este foarte scăzută (10-50 pmol)/10^7 celule) în cazul leucocitelor şi celulelor HL60. Ea ar putea proveni din ceramide printr-un "ciclu sfingomielinic" care este dependent de diferenţiere. Cantitatea efectului şi concentraţia necesară sunt totuşi diferite de acele efecte prezentate de gangliozide şi cataboliţii lor după cum s-a descris anterior. (ii) Sfingozina, dacă acţionează ca modulator fiziologic al proliferării celulare, poate acţiona nu numai prin intermediul PK-C după cum s-a crezut iniţial ci deasemenea prin intermediul receptorilor factorului de creştere sau printr-un canal neidentificat care conduce la eliberarea Ca^{2+} intracelular. (iii) Efectul inhibitor al sfingozinei nesubstituite (indiferent dacă este vorba despre izomerii D-eritro-, L-eritro-, L-treo-) asupra activităţii PK-C a celulelor A431 este minim, în timp ce DMS arată o inhibiţie stereospeci-fică puternică a PK-C în cazul metodei veziculare.Un astfel de efect nu apare în condiţii de micele mixte. (iv) În celule marcate metabolic cu (^{3}H)serină numai DMS (dar nu şi sfingozină nesubstituită) este marcată atât în celule A431 cât şi în limfocite de şoarece. DMS a fost identificat chimic prin spectrofotometrie de masă în cancerul de creier uman sau de colon iar o conversie enzimatică specifică a sfingozinei la DMS a fost demonstrată în creier de şoarece (Y. Igarashi şi S. Hakomori, 1989).

Astfel, efectul sfingozinei poate opera prin intermediul DMS. Acest sistem este independent de sistemele modulatoare prin intermediul polisialogangliozidelor, GM3 şi lizo-GM3, şi probabil a altor lizo-GSL, care ar putea utiliza un mecanism diferit neimplicând DMS. De ex. efectul inhibitor puternic al gangliozidului GM3 asupra kinazei receptorului EGF se bazează pe prevenirea dimerizarii EGF-dependente a receptorului în timp ce DMS poate acţiona direct asupra kinazelor.

Glicosfingolipidele ca receptori pentru interacţia celulară. Ipoteza că gangliozidele acţionează ca receptori pentru toxinele bacteriene şi hormoni a fost propusă pornind de la interacţiile observate între gangliozide şi aceşti factori bioactivi. Specificitatea interacţiei între factorii bioactivi şi GSL este obscură, iar semnificaţia fiziologică a acestei interacţiuni rămâne să fie clarificată Chiar în cazul toxinei holerei, a cărei specificitate de legare la GM1 a fost caracterizată temeinic, nu există dovada concludentă că GM1 joacă realmente un rol în

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

patogeneza holerei. Celulele epiteliale intestinale constituie ţinta iniţială a toxinei holerei. Mai recent a apărut un tablou mai clar al interacţiunilor GSL cu microorganismele (îndeosebi a unei varietăţi de bacterii) întărind posibilitatea că GSL pot acţiona ca receptori în infecţiile microbiene. Numeroase microorganisme ar putea avea lectine specifice care recunosc resturile glucidice specifice ale GSL din celula gazdă. În multe cazuri recunoaşterea este direcţionată spre un fragment de catenă glucidică internă mai degrabă decât către o structură terminală (K.-A. Karlsson, 1989).

Faptul aprioric că schimbări apreciabile în compoziţia GSL sunt corelate îndeaproape cu schimbări ale recunoaşterii celulare în timpul ontogenezei şi oncogenezei sugerează că GSL funcţionează ca situsuri receptori în recunoaşterea celulă-celulă. În sprijinul acestui concept există dovada că GSL sau secvenţele oligozaharidice corespunzătoare, în particular compuşi de sinteză multivalenţi, blochează recunoaşterea celulă-celulă, o etapă esenţială în timpul embriogenezei şi morfogenezei. Este natural ca proteinele suprafeţei celulare care interacţionează cu secvenţe glucidice specifice ale GSL au fost intens studiate, de ex. glico-ziltransferazele, hidrolazele şi lectinele. A existat presupunerea că un situs de recunoaştere celulară l-ar putea constitui glicoziltransferazele eventual prezente pe suprafaţa celulară. Totuşi, în majoritatea celulelor, localizarea glicoziltransferazelor pare a fi limitată la membrana Golgi, după cum s-a dovedit prin utilizarea anticorpilor monoclonali la glicozil transferaze (T. White şi colab., 1990). Lopez şi Shur (1987) au dovedit că ß-Gal transferaza este localizată la suprafaţa celulară a spermatozoizilor şi că are probabil o funcţie în recunoaşterea celulară în timpul fertilizării. S-a arătat recent că antigenul CD75 al diferenţierii limfocitelor B are o secvenţă aproape identică cu α2-6 sialil transferaza (I. Stamencovic şi colab., 1990), cu toate că semnificaţia sa funcţională este încă necunoscută.

În mod similar exprimarea pe suprafaţă a lectinelor endogene din majoritatea celulelor animale este limitată, cu excepţia: cazurilor receptorului hepatocitului care recunoaşte asialoglicoproteina serică (receptorul Ashwell), lectinei care leagă galactoza, puternic exprimată la suprafaţa celulelor melanoma şi a altor celule tumorale, şi receptorului de legare a leucocitelor. Omologiile secvenţiale cu lectinele animale au fost găsite la câţiva receptori (cunoscuţi ca LECCAM sau grupul selectinelor) implicaţi în adezivitatea leucocitelor la celulele endoteliale sau la matrice. ELAM1 pe endoteliu, GMP-140 pe plachete şi endoteliu, MEL14 pe leucocite de şoarece şi omologul uman Leu 8/LAM I, au fost caracterizate ca având un motiv structural comun, adică omologia N-terminală a lectinei care urmează omologiei EGF şi domeniului reglator al complementului. Omologia lectinei a fost găsită deasemenea în receptorii IgE ai limfocitelor umane. Cu toate acestea, specificităţile şi funcţiile de legare a glucidelor nu sunt cunoscute pentru "domeniul lectinelor" acestor receptori. Aceste lectine asociate la receptori pot avea roluri importante în procesele inflamatorii. Recent s-a demostrat în membrana celulelor din creier de şobolan prezenţa unei proteine care leagă specific gangliozidele, cu toate că exprimarea ei la suprafaţa celulară este încă necunoscută. Pe de altă parte cele mai multe lectine au fost găsite în nucleu sau citoplasmă, iar semnificaţia lor ectobiologică în procesele de recunoaştere celulară nu este deplin înţeleasă. Ele ar putea avea o funcţie primară în reglarea mobilizării intracelulare a glicoproteinelor (I. K. Moutsatsos şi colab., 1987).

6.2. Reglarea creşterii celulare de către gangliozide

Importanţa posibilă a gangliozidelor în creşterea celulară a început să fie recunoscută cu mai mult de două decade în urmă după demonstrarea schimbărilor profunde ale compoziţiei şi biosintezei gangliozidelor în timpul diferenţierii, transformării şi ciclului celular (S. Hakomori şi colab., 1981). În anii recenţi s-au folosit mai multe modalităţi pentru a studia rolul gangliozidelor în reglarea creşterii celulare. S-a dovedit că gangliozidele exogene pot afecta direct creşterea şi

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

diferenţierea, mai degrabă decât să sufere pur şi simplu schimbări ca o consecinţă a acestor procese. De exemplu adăugarea de gangliozid GM3 la carcinomul A431 şi fibroblaştii Swiss 3T3 a redus proliferarea EGF-dependentă şi activitatea tirozin kinazică asociată receptorului EGF (E. G. Bremer şi colab., 1986). Uşoare modificări în structura lui GM3 au condus la efecte opuse asupra creşterii celulare şi activităţii tirozin kinazice. Recent s-a arătat că gangliozidul GM3 suferă un turnover reglat de creştere şi aceasta a condus la sugestia că o activitate sialidazică extracelulară sau legată de membrană poate juca un rol în modularea creşterii celulare prin reglarea nivelului GM3. O altă modalitate utilă de a examina funcţiile fiziologice potenţiale ale GSL este inhibiţia biosintezei gangliozidelor.

Există exemple edificatoare de modificare a biosintezei gangliozidelor prin inhibiţia competitivă de substrat, rezultând schimbări dramatice ale creşterii celulare şi morfologice (S. Usuki şi colab., 1988). O modalitate de a determina dacă gangliozidele endogene sunt molecule biomodulatoare fiziologic relevante s-a ivit prin utilizarea liganzilor care interacţionează specific cu gangliozidele individuale, ca de exemplu anticorpi antigangliozide (J. K. F. Chan 1987) sau toxinele care leagă gangliozidele. Spiegel et al.(1992) au dezvoltat tehnica subunităţii B a toxinei holerei (TH), care leagă specific şi cu afinitate ridicată gangliozidul GM1, ca instrument de studiu al funcţiei gangliozidului GM1 endogen. Această modalitate a fost folosită extensiv pentru a acumula date importante asupra rolului gangliozidului GM1 în proliferarea celulară şi transducţia semnalului într-o varietate de sisteme celulare.

În studii anterioare s-a găsit că subunitatea B stimulează creşterea timocitelor în repaus şi a culturilor în repaus de fibroblaşti de şoarece 3T3. Extinderea acestor studii la celule transformate au arătat că, contrar efectului pe celule în repaus, subunitatea B inhibă creşterea fibroblaştilor 3T3 *ras*-transformaţi şi celulelor C6 din glioma de şobolan cu nivele crescute de GM1. În plus, subunitatea B nu numai că inhibă creşterea celulelor astrogliale şi celulelor N18 de neuroblastoma de şoarece, dar induce deasemenea diferenţierea pronunţată a acestor celule. Răspunsul bifazic la subunitatea B a aceloraşi fibroblaşti 3T3 depinzând de starea lor de creştere sugerează că gangliozidul GM1 poate juca un rol fundamental ca reglator bimodal al creşterii celulare. Capacitatea gangliozidului GM1 de a modula negativ sau pozitiv semnale de creştere nu se coreleaza neaparat cu densitatea sa pe suprafaţa celulară (nivelul GM1 pe suprafaţa celulară este redus la celulele 3T3 în creştere şi se măreşte pe măsură ce celulele devin inhibate prin contact). Rezultate recente arată că raspunsul bimodal la subunitatea B nu este numai o funcţie de concentraţie a lui GM1 pe suprafaţa celulară, ci mai degrabă că stadiul de creştere poate determina soarta semnalului transdus prin interacţiunea subunităţii B şi gangliozidului GM1 (N. E. Buckley şi colab., 1990). În acord cu această ipoteză s-a observat că subunitatea B are o acţiune dual în fibroblaşti Swiss 3T3 în repaus, depinzând de contextul altor factori de creştere (S. Tsuji şi colab., 1988). În timp ce subunitatea B potenţează efectul lui EGF, insulinei, şi al factorului de creştere derivat din plachete, ea diminuează stimularea sintezei ADN induse de esteri forbol via protein kinaza C (S. Spiegel, 1989). Efectele duale ale subunităţii B au fost deasemenea corelate cu diferite faze ale ciclului celular. Efecte duale similare ale subunităţii B au fost deasemenea găsite la celule FRTL-5 în repaus provenind din tiroidă de şobolan.

Gangliozidul GM1 modulează mecanisme de semnal transmembranar. Utilizarea subunităţii B a furnizat un instrument unic de investigare a mecanismelor moleculare determinate de acţiunea gangliozidului GM1. Legarea subunităţii B la gangliozidul endogen GM1 nu creşte sistemele clasice de mesager secund ca de ex. cAMP, DAG (un activator endogen al protein kinazei C) sau IP3 (care mobilizează calciul din rezervele interne), deoarece subunitatea B nu activează adenilat ciclaza, schimbul Na^+/H^+, fosfolipaza C sau protein kinaza C. Cu toate acestea subunitatea B mediază o creştere intensă de calciu intracelular liber rezultând dintr-un influx net din surse extracelulare. Alte studii au demonstrat că creşterea în $[Ca^{2+}]_i$ ca atare nu este suficientă pentru a explica efectele subunităţii B, deoarece ionoforii Ca^{2+}, în contrast cu subunitatea B, nu

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

stimulează sinteza ADN în fibroblaşti 3T3 în repaus şi nu creşte sinteza numatrinei, o proteină nucleară a cărui sinteza este îndeaproape corelată cu pregătirea celulară pentru mitogeneză.

Recent s-a arătat implicarea unei proteine care leagă GTP, sensibilă la toxina pertussis, într-un proces decalat de al sintezei ADN mediat prin interacţia gangliozidelor endogene cu subunitatea B. Mecanismul respectiv de implicare a acestei proteine Gi în sinteza ADN nu este clar încă, dar în mod evident nu este corelat la nişte efecte de cuplare la fosfolipaza C sau adenilat ciclază sau pe influxul calciului. Luate împreună, datele descrise mai sus arată că gangliozidul GM1 poate modula proliferarea celulară printr-o cale de semnalizare a creşterii, nedefinită încă.

Rezultate recente din diferite laboratoare sugerează două alte mecanisme posibile care ar explica acţiunile gangliozidelor în reglarea creşterii celulare. Gangliozidele pot acţiona prin modificarea directă a receptorilor factorilor de creştere sau prin modificarea activităţii unor protein kinaze în interiorul celulei. O altă ipoteză este că produşii turnover-ului sfingolipidelor pot media răspunsurile celulare.

6.2.1. Sfingozina ca reprezentant al unei noi clase de mesageri secunzi intracelulari

Turnover-ul fosfoglicerolipidelor, adesea corelat cu ciclul fosfoinozitidelor, iar mai recent cu hidroliza fosfatidil colinei, joacă un rol important în iniţierea unei varietăţi de răspunsuri celulare, incluzând creşterea celulară (A. H. Merrill şi V. L. Stevens, 1987). Un ciclu al sfingolipidelor, comparabil cu ciclurile fosfoglicerolipidelor, cu produşii de transducţie mesageri proprii, poate juca un rol similar (E. A. Dennis şi colab., 1991). În plus, deoarece sfingolipidele sunt localizate îndeosebi în foiţa externă a membranei plasmatice, în timp ce majoritatea ţintelor efectorilor sunt intracelulare, este logic de a căuta produşii metabolici ai sfingolipidelor complexe ca transductori posibili de informaţie în celule.

O cale tentantă între sfingolipide şi transducţia semnalului a apărut recent când s-a constatat că sfingozina, un metabolit al glicosfingolipidelor de membrană, inhibă puternic şi specific protein kinaza C in vitro. Sfingozina şi alte amine alifatice cu catenă lungă competiţionează cu diacilglicerolul (DAG) şi forboldibutiratul pentru situsurile de legare specifică pe protein kinaza C. Entuziasmul în acest domeniu a crescut odată cu demonstraţia că sfingozina exogenă poate inhiba *in vivo* o varietate de procese dependente de protein kinaza C. Sfingozina inhibă răspunsurile plachetelor şi neutrofilelor precum şi diferenţierea celulelor HL-60 indusă de către forbol şi are deasemenea activitate de promotor antitumoral.

Dacă într-adevăr sfingozina constituie o altă clasă de mesageri lipidici secunzi ea trebuie să fie prezentă în celule în cantităţi suficiente pentru a produce efectul observat. Ulterior, a devenit posibilă determinarea cantitativă a sfingozinei libere în celule datorită dezvoltării unei metode HPLC de către Merrill şi colab., (E. Wilson şi colab., 1988) care permite detectarea precisă de cantităţi mici de diferite baze sfingoide. S-a arătat prin această metodă că neutrofilele nu numai că prezintă cantităţi apreciabile de sfingozină liberă dar au deasemenea mecanisme metabolice pentru reglarea nivelului său, depinzând de răspunsurile la stimulii particulari. În alte studii diferenţierea celulelor preadipocite 3T3-L1 ca răspuns la dexametazonă e însoţită de creşterea nivelului sfingozinei rezultând din activarea sfingomielinazei neutre membranare. În plus, sfingozina exogenă mimează efectele dexametazonei asupra absorbţiei de 2-deoxiglucoză. Aceste rezultate indică turnoverul sfingolipidelor poate fi implicat în mecanismul de acţiune al hormonilor corticosteroizi.

În bilanţ, luând în considerare rezultatele discutate mai sus, sfingozina are proprietăţi adecvate care o fac drept un candidat potrivit pentru a funcţiona ca mesager intracelular secund:

1) sfingozina prezintă diferite răspunsuri în multe tipuri de celule;
2) proprietăţile structurale ale acestei molecule permit mobilitatea ei ridicată şi încorporarea ei membranară şi totodată o fac accesibilă la diferite sisteme efectoare;

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

3) nivelul sfingozinei libere în celule este foarte scăzut şi poate fi reglat de către stimuli fiziologici;
4) turnoverul sfingozinei prin fosforilare pentru a forma sfingozin-1-fosfat urmat de clivarea la o aldehidă cu catenă lungă şi fosforil etanolamină este extrem de rapidă.

Recunoscând importanţa acestei chestiuni Hannun, Bell, Merrill şi colaboratorii au propus că sfingozina poate funcţiona ca un inhibitor endogen al protein kinazei C, opunându-se acţiunii diacilglicerolului, fie într-o manieră tonică în condiţii de repaus, fie într-o manieră acută ca răspuns la agonişti. Ea reprezintă astfel legătura funcţională lipsă din patologia gangliozidelor (Y. A. Hannun şi R. M. Bell, 1987).

Cu toate că există o informaţie bogată că sfingozina are diverse funcţii biologice care sunt dependente de protein kinaza C, alte studii indică un rol multilateral al sfingozinei, care nu pare a fi restrâns la acţiunea sa *via* protein kinaza C. Sfingozina inhibă hormonul de eliberare al tirotropinei care se leagă la celulele pituitare şi activitatea tirozin kinazică a receptorului insulinei, creşte afinitatea şi numărul receptorilor EGFcelulari în celulele de carcinom epidermoid uman A431, şi produce retractarea/degenerarea neuritelor. În plus, s-a arătat că sfingozina acţionează pe un număr de alte tipuri de ţinte, cauzând inhibiţia următoarelor enzime: CTP-fosfocolin citidil transferaza, o enzimă cheie în sinteza fosfatidilcolinei, ATPaza Na^+/K^+, enzimele calmodulin dependente, cazein kinaza II, fosfatidil fosfohidrolaza, DAG kinaza, şi activarea fosfolipazei D. Cu toate că aceste date pot fi valoroase din punct de vedere farmacologic, trebuie avut grijă când se iau în considerare aceste ţinte ca efectori fiziologici ai acţiunii sfingozinei, deoarece majoritatea studiilor au fost realizate cu concentraţii înalte de sfingozină *in vitro*.

Sfingozina reglează proliferarea celulară. Deoarece protein kinaza C pare a juca un rol pivot în proliferarea celulară s-a investigat efectul sfingozinei asupra creşterii fibroblaştilor Swiss 3T3, un model convenabil pentru studiul activării celulare şi a creşterii. În mod surprinzător, în contrast cu relatările anterioare că sfingozina este puternic citotoxică pentru o varietate de tipuri celulare, s-a găsit că sfingozina la concentraţii joase stimulează sinteza ADN şi proliferarea celulară a culturilor în repaus de fibroblaşti Swiss 3T3 (H. Zhang şi colab., 1990). În contrast cu efectul ei asupra protein kinazei C (Y. A. Hannun şi R. M. Bell, 1989), efectul mitogen al sfingozinei este foarte specific deoarece analogii structural înrudiţi ai sfingozinei nu mimează efectele mitogene ale sfingozinei şi nici nu potenţează efectul altei combinaţii de factori de creştere. În plus numai izomerul natural al sfingozinei, D-eritro-sfingozina, are acest efect biologic, în timp ce L-treo-sfingozina este complet inactivă. Efectul sfingozinei asupra proliferării celulare este în mod clar independent de protein kinaza C. Dovezi din mai multe direcţii sprijină această concluzie. Întâi, sfingozina potenţează efectul mitogenic al promotorului tumoral 12-O-tetradecanoil forbol 13 acetat (TPA). Efectul sinergistic al concentraţiilor optime de sfingozină şi TPA sugerează că ei nu acţionează printr-o cale comună de acţiune mitogenică În al doilea rând, în contrast cu sfingozina, H-7, un inhibitor al protein kinazei C, inhibă răspunsul mitogenic la TPA. Este important de notat că sfingozina, spre deosebire de H-7, nu inhibă stimularea fosforilării induse de TPA a unei proteine celulare acide de 80 kDa, care este un marker specific al activării proteinkinazei C în fibroblaştii Swiss 3T3. Este interesant că stearilamina, care este un inhibitor la fel de puternic al protein kinazei C, *in vitro* şi *in vivo*, ca sfingozina, nu mimează efectul mitogen al sfingozinei şi nu potenţează efectul altor factori de creştere. Mai degrabă, similar efectului lui H-7, aceasta inhibă mitogeneza indusă de TPA. În al treilea rând, concentraţiile mitogene ale sfingozinei nu competiţionează cu dibutirat forbol pentru receptori specifici pe celule intacte.

În final, inhibarea protein kinazei C nu are nici un efect asupra mitogenezei mediate de sfingozină.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Rezultatele de mai sus sugerează că sfingozina poate juca un rol important ca reglator pozitiv al creşterii celulare, care acţioncază printr-o cale independentă de protein kinaza C. Numai concentraţii înalte citotoxice de sfingozină au efect asupra protein kinazei C în sistemul indicat, aratând că sfingozina nu poate fi un modulator fiziologic al protein kinazei C dar poate modula o cale nouă de transducţie a semnalului, şi că ţinta acţiunii sfingozinei rămâne să fie descoperită.

Ţintele sfingozinei. Există multe dovezi care demonstrează că factorii de creştere îşi mediază acţiunea printr-un metabolism crescut al fosfoinozitidelor. Există în multe cazuri un catabolism crescut al altor fosfolipide ca rezultat al activării fosfolipazelor C, D, A_2. Astfel, s-a sugerat că în plus faţă de cei doi intermediari lipidici, diacilglicerol şi inozitol trifosfat (IP_3), alţi metaboliţi ai lipidelor membranare, ca de exemplu acidul fosfatidic şi acidul arahidonic, joacă deasemenea roluri cruciale în transducţia semnalului şi proliferarea celulară. Recent s-a observat că efectul mitogenic al sfingozinei este însoţit de o creştere a nivelului acidului fosfatidic, care este un mitogen puternic pentru fibroblaştii Swiss 3T3. Astfel, sfingozina poate juca un rol important ca reglator pozitiv al creşterii celulare care acţionează prin intermediul acidului fosfatidic. Acidul fosfatidic nu numai că este un mitogen puternic pentru o varietate de tipuri celulare dar el induce deasemenea exprimarea protooncogenelor c-*fos* şi c-*myc*. Recent s-a arătat că anumiţi factori de creştere stimulează producerea acidului fosfatidic prin activarea fosfolipazei D şi s-a sugerat că acidul fosfatidic este esenţial în cascadele de transducţie a semnalului mitogenic şi poate funcţiona ca mesager secund intracelular. În plus, acidul fosfatidic ar putea fi implicat în activitatea *ras* modulată pozitiv în timpul stimulării mitogene prin efectul său inhibitor asupra proteinei care activează GTPaza. Astfel, în vederea rolului proeminent al acidului fosfatidic în transducţia semnalului şi proliferarea celulară, observaţia că sfingozina, în concentraţii mitogene, creşte nivelul acidului şi deasemenea mimează efectele acidului fosfatidic asupra transducţiei semnalului, are implicaţii importante pentru acţiunile biologice ale sfingozinei.

Stimularea nivelului acidului fosfatidic de către sfingozină. O creştere a nivelului acidului fosfatidic se poate realiza prin mai multe căi cunoscute, cum ar fi stimularea fosfolipazei D, inhibiţia fosfohidrolazei acidului fosfatidic, creşterea acilării glicerol 3-fosfatului, sau creşterea fosforilării diacilglicerolului catalizată de către DAG kinază. Recent s-a arătat că sfingozina stimulează activitatea fosfolipazei D în mai multe tipuri de celule (H. Zhang şi colab., 1990). Sfingozina descreşte nivelul fosfatidil colinei în celule hibride neuroblasto-glioma NG 108-15 şi fibroblaşti Swiss 3T3 şi stimulează hidroliza fosfatidil etanolaminei în fibroblaşti NTH 3T3 (Z. Kizz şi W. B. Andersson, 1990). Sfingozina inhibă deasemenea activitatea fosfohidrolazei acidului fosfatidic *in vitro*. În plus, studii *in vitro* demonstrează că sfingozina activează izoenzima de 80 kDa a DAG kinazei în timp ce inhibă izoenzima de 150 kDa. Astfel, efectul sfingozinei asupra DAG kinazei ar putea fi diferit, depinzând de tipul de izoenzimă a DAG kinazei prezent într-un anumit tip de celulă. În această privinţă s-a observat că sfingozina determină acumularea acidului fosfatidic la linia celulară Jurkat leucemică umană, care s-a găsit a fi îmbogăţită în forma izoenzimei 80 kDa a DAG kinazei. Se pare că sfingozina poate avea acţiuni multiple asupra reglării nivelului acidului fosfatidic în diferite tipuri celulare. Recent s-a sugerat că ciclul DAG poate influenţa ciclul sfingolipidelor (R. N. Kolesick, 1987).O completare importantă la aceste căi este reglarea nivelului acidului fosfatidic de către sfingozină, ceea ce indică faptul că, invers, turnoverul sfingolipidelor poate regla ciclul DAG. Interacţia încrucişată între aceşti metaboliţi lipidici care acţionează ca mesageri secunzi şi funcţia acestor căi sincronizate sunt deocamdată neclare.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Metaboliții sfingozinei mediază acțiunile acesteia. Complexitatea fenomenelor a devenit mai evidentă când s-a arătat că în celule există metaboliți ai sfingozinei care au efecte puternice asupra creșterii celulare. Hakomori și colab. au găsit că un derivat metilat al sfingozinei, N,N-dimetil sfingozina, este un inhibitor mult mai puternic al protein kinazei C și crește activitatea tirozin kinazică a *src*-kinazei și receptorului EGF (B. Felding-Haberman și colab., 1990). Ei au sugerat că unele, sau chiar toate, dintre efectele sfingozinei ar putea acționa prin intermediul N,N-dimetilsfingozinei. În plus, experimente realizate în laboratorul lui Spiegel și colab., au arătat că încă doi compuși derivați din sfingozină, sfingozin 1-fosfatul și sfingozin fosforil colina (SPC; lizosfingomielina) sunt deasemenea mitogeni foarte puternici în fibroblaștii Swiss3T3 (Zhang H și colab., 1991). Posibilitatea ca acești noi derivați ai sfingozinei pot regla procesele celulare indică noi direcții de cercetare.

Recent s-a studiat formarea și funcția unui fosfolipid unic, un metabolit al sfingozinei, care a fost identificat ca sfingozin 1-fosfat. S-a găsit că sfingozina induce o creștere rapidă a nivelului sfingozin fosfatului cu un răspuns dependent de doză ce se corelează îndeaproape cu efectul ei mitogenic. Similar cu sfingozina, sfingozin 1-fosfatul stimulează sinteza ADN și diviziunea celulară în culturi în repaus de fibroblaști Swiss 3T3 prin intermediul unei căi independente de protein kinaza C. Cu toate că atât sfingozina cât și sfingozin 1-fosfatul acționează sinergic cu o mare varietate de factori de creștere, nu există nici un efect aditiv sau sinergic ca răspuns la o combinare de sfingozină și sfingozin 1-fosfat, indicând că cei doi compuși modulează proliferarea celulară pritr-o cale comună. Trebuie notat că sfingozin 1-fosfatul stimulează sinteza ADN într-o măsură mai mare decât sfingozina și necesită concentrații mult mai joase pentru răspunsul maxim, sugerând că el poate media activitatea mitogenică a sfingozinei.

Ghosh et al. (1990) au relatat că sfingozina induce o eliberare rapidă și puternică de calciu din rezervele intercelulare, atât cele insensibile cât și sensibile la IP_3, în celule per-meabilizate de musculatură netedă, și s-a propus că acest efect este mediat *via* conversia sfingozinei la sfingozin 1-fosfat. Totuși, dovada experimentală directă că sfingozin 1-fosfatul însuși poate induce eliberarea calciului din surse interne nu a fost prezentată. Folosind un sistem de descriere numeric pentru măsurarea $[Ca^{2+}]$ citosolic s-a observat că sfingozin 1-fosfatul este un agonist puternic mobilizator de calciu în fibroblaștii 3T3 viabili. Creșterea rapidă a calciului citosolic liber este independentă de prezența calciului în mediul extern indicând că răspunsul este datorat mobilizării calciului din rezervele interne. Contrar sfingozinei, sfingozin 1-fosfatul stimulează eliberarea rapidă de calciu din sursele interne la temperatura camerei. În plus, concentrația de sfingozină necesară pentru a elibera calciul la 37°C este mai înaltă decât concentrația efectivă de sfingozin 1-fosfat. Dependența de tem-peratură a efectului sfingozinei asupra calciului intracelular, corelat cu lag-ul crescut în acțiunea sa sprijină sugestia că sfingozina necesită o conversie enzimatică la sfingozin-1-fosfat pentru a-și exercita funcția. Sfingozin 1-fosfatul este produs din sfingozină prin acțiunea unei kinaze specifice în calea de degradare majoră a sfingolipidelor. Sfingozin 1-fosfatul este degradat rapid la trans 2-hexadecenal și fosforil etanolamină prin acțiunea unei liaze microzomale, recent relatată a fi localizată în reticulul endoplasmic (P. P. Van Veldhoven și G. P. Mannaerts (1991). Astfel, sfingozin 1-fosfatul poate constitui un candidat adecvat pentru funcția de mesager intracelular secund. Rezultatele prezentate de Spiegel și colab., sunt în acord cu astfel de ipoteze. Sfingozin 1-fosfatul este produs rapid ca răspuns la concentrații mitogene de sfingozină, este mitogen el însuși pentru fibroblaștii 3T3, induce o creștere rapidă în nivelul acidului fosfatidic și mediază eliberarea calciului în celule viabile. Astfel sfingozin 1-fosfatul poate fi un component important al sistemului de mesageri intracelulari secunzi care este implicat în eliberarea calciului și reglarea creșterii celulare induse de sfingozină.

Cu toate acestea există argumente față de această ipoteza. Sfingozin 1-fosfatul a fost adăugat exogen la celule Swiss 3T3 și este dificil de comparat efectele sale cu cele ale

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

compusului generat endogen. În această privinţă trebuie arătat faptul că cantitatea de sfingozin 1-fosfat format intracelular ca răspuns la o concentraţie mitogenică de sfingozină este aproximativ de acelaşi ordin de mărime ca şi cel absorbit de celule după tratare cu sfingozin 1-fosfat. Din păcate, localizarea subcelulară a sfingozin 1-fosfatului este încă necunoscută şi aceasta face comparaţia concentraţiilor extracelulară şi intracelulară ambiguă.

Trebuiesc luate în consideraţie implicaţiile posibile ale sfingozin fosforil colinei (SPC), un mitogen extrem de puternic pentru o varietate de tipuri celulare (N. N. Desai şi S. Spiegel, 1991). SPC este deasemenea extrem de eficient în eliberarea calciului în celule viabile. Cu toate acestea căile sale de biosinteză şi mecanismele turnoverului sunt necercetate şi ar putea fi un domeniu de cercetare promiţător.

Rezultatele de mai sus ridică întrebarea dacă alţi compuşi fiziologici care reglează creşterea vor modifica degradarea glicosfingolipidelor sau sfingomielinei pentru a regla nivelul sfingozinei endogene care la rândul ei va modula nivelul sfingozin 1-fosfatului. Dacă lucrurile stau aşa sfingozin 1-fosfatul ar putea funcţiona nu numai ca un nou mesager secund intracelular, inducând eliberarea de calciu din rezervele interne, ci , deasemenea, într-o buclă feedback pozitivă, ca un amplificator al cascadei fenomenelor care urmează stimulării mitogene prin intermediul efectului său asupra nivelului acidului fosfatidic. Această ipoteză privind funcţiile celulare ale sfingozinei şi metaboliţilor săi necesită studii suplimentare.

Cu toate că un ciclu al sfingolipidelor, comparabil cu ciclurile fosfoglicerolipidelor, cu produşii proprii de transducţie mesageri (sfingozină sau ceramid) este o ipoteză foarte tentantă rămân deschise o serie de întrebări: este sfingozina molecula bioefector reală în acest ciclu sau sunt implicaţi alţi intermediari? Are ciclul un sens biologic universal? Funcţionează el similar în toate ţesuturile şi celulele? Există diferite căi ce pot fi activate şi dacă este aşa există diferiţi mesageri care să fie generaţi depinzând de tipurile de celule sau stimuli? Rezultatele recente din diferite laboratoare furnizează puncte de vedere noi în complexitatea ciclului propus. În plus faţă de metabolitii sfingozinei discutaţi mai sus s-a sugerat că ceramidul ar putea juca un rol important în diferenţierea celulară. Un metabolit nou al ceramidului, ceramid 1-fosfatul, a fost desemenea descris dar funcţia sa este numai parţial studiată. Deoarece sfingozina şi ceramidul sunt interconvertibili prin simpla reacţie acilare-deacilare, ar putea fi responsabili pentru răspunsurile celulare fie unul fie celălalt.

6.3. Metabolismul gangliozidului GM2 în fibroblaşti de la pacienţi cu gangliozidoza GM2

Glicosfingolipidele (GSL) sunt componente ale membranelor plasmatice ale celulelor animale. Ele sunt ancorate în membrana celulară prin ceramid (N-acilsfingozină) care constituie fracţiunea hidrofobă, în timp ce partea hidrofilă mono- sau oligozaharidică se extinde în spaţiul extracelular. Împreună cu glicoproteinele şi glicozaminoglicanii, GSL formează glicocalixul suprafeţei celulare. Modelul GSL este caracteristic tipului de celule, stadiului de diferenţiere şi transformării oncogene. Cu toate că unele GSL conţinând acid sialic au fost identificate ca situsuri de legare pentru toxine şi viruşi, funcţiile lor fiziologice rămân obscure. Până acum a fost elucidată structura a peste 100 GSL. GSL conţinând acid sialic, numite gangliozide, sunt lipide tipice ale suprafeţei neuronale şi predomină în materia cenuşie. Sulfatidul şi galactozilceramidul, în calitatea lor de componente principale ale mielinei, predomină în oligodendrocite în timp ce glicolipidele din seria globo predomină în fibroblaşti. Orice dezordine metabolică a GSL afectează în principal acele ţesuturi în care GSL corespunzător este concentrat (K. Sandhoff şi P. Leinekugel, 1990).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Pentru a obține informații despre localizarea, mișcarea intracelulară și metabolismul GSL în culturi de celule s-au folosit diferiți derivați ai GSL, în special ai gangliozidelor, conținând markeri de spin, izotopi radioactivi, markeri de fluorescență sau biotină. Studii pe culturi de celule cu gangliozide conținând markeri de spin au arătat că acestea sunt încorporate încet în membrana plasmatică, unde ele dobândesc o poziție similară gangliozidelor endogene.

Experimente metabolice pe culturi de celule cu diferiți derivați ai gangliozidelor arată că ele participă, după inserție în membrana plasmatică, la curgerea membranară intracelulară. Ele pot intra în compartimentul lizozomal pentru a fi degradate prin acțiunea hidrolazelor, sau, într-o măsură mai redusă, să ajungă în aparatul Golgi, unde sunt utilizate pentru biosinteza GSL mai complexe. Experimente cu gangliozide dublu marcate arată că acele GSL care ajung în complexul Golgi sunt transportate direct în acest compartiment fără să treacă prin lizozomi. Glicozilarea directă în aparatul Golgi a fost observată în cazul gangliozidelor: CM2, GM1 și GD1a, precum și cu amide sintetice ale gangliozidelor GM2 și GM1. Studii de microscopie electronică pe fibroblaști cu gangliozidul GM1 biotinilat, sprijină această ipoteză. Dimpotrivă, când celulelor provenite de la bolnavi cu boala Farber li se administrează gangliozidul GM3 sau când celulelor normale li se administrează GM3-amidă, nu se mai sintetizează gangliozide mai complexe. Acest fapt demonstrează că aceste GSL nu intră în calea de biosinteză chiar dacă ajung în complexul Golgi. Totuși, datorită activității scăzute a N-acetilgalactozaminil-transferazei din veziculele Golgi ale ficatului de șobolan, nu poate fi exclus faptul că reglicozilarea acestor GSL are loc foarte încet, sub limita de detecție a procedeului utilizat. Căile intracelulare ale GSL sunt numai parțial cunoscute.

Biosinteza GSL începe cu formarea ceramidului în reticulul endoplasmic. Trebuie clarificat dacă sinteza GlcCer sau GalCer are loc deasemenea în reticulul endoplasmic sau în latura citosolică a aparatului Golgi. Toate celelalte glicozil- și sialiltransferaze implicate în biosinteza GSL sunt localizate în cisternele Golgi. Aceste enzime legate de membrană determină legarea secvențială a Gal, GalNAc și AS la catena oligozaharidică, utilizând derivații nucleotidici corespunzători ai glucidelor. Inhibitori ai transportului nucleotido-glucidelor prin membrana Golgi, ca de ex. tunicamicina, blochează biosinteza gangliozidelor. Experimente de inhibiție competitivă, utilizând lactozilceramid, gangliozidul GM3 și gangliozidul GD3 ca substrate sugerează că transferul GalNAc în aparatul Golgi din ficat de șobolan, ducând la gangliozidele GA2, GM2 și respectiv GD2, este catalizat de către o singură enzimă. Același lucru s-a demonstrat pentru reacția care duce la gangliozidele GM1b, GD1a și GT1b. Studii foarte recente au dovedit că GA1-, GM1- și GD1b sintazele sunt enzime identice, în aparatul Golgi din ficat de șobolan, astfel că a fost propus un model nou pentru biosinteza gangliozidelor, care include rezultatele de mai sus. Gangliozidele sunt constituenți caracteristici ai suprafeței externe a celulelor animale și sunt abundente îndeosebi în membranele neuronale. Există de mai multă vreme ipoteza că ele joacă un rol important în recunoașterea reciprocă a celulelor, în adezivitatea celulară precum și în inhibiția de contact a creșterii și a fost deasemenea invocat rolul lor ca situsuri de legare a coreceptorilor pentru interferon și pentru hormoni.

Sinteza gangliozidelor are loc în aparatul Golgi iar degradarea lor este realizată în lizozomii secundari prin acțiunea secvențiala a mai multor glicozidaze. Se cunosc puține lucruri despre metabolismul lor intermediar, cum ar fi modificarea și interconversia a diferite gangliozide.

Interesul asupra metabolismului gangliozidelor a fost trezit datorită rolului lor ca substanțe de depozit în anumite maladii moștenite numite gangliozidoze. În aceste maladii deficiența uneia dintre glicozidazele lizozomale perturbă degradarea normală a gangliozidelor, care se acumulează în lizozomi. Pe baza compusului depozitat pot fi distinse două grupuri de gangliozidoze: deficiența ß-galactozidazei lizozomale duce la gangliozidoza GM1, în timp ce diferite variante enzimatice ale gangliozidozei GM2 sunt cauzate de către defecte ale

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

hexozaminidazei A (varianta B, maladia Tay-Sachs) sau defecte ale ambelor hexozaminidaze lizozomale majore, A şi B, (varinta O, maladia Sandhoff) sau prin deficienţa cofactorului proteic neenzimatic necesar pentru interacţia hexominidazei A cu substratul ei glicozidic (varianta AB). Cu toate că defectele enzimei respective au fost studiate intens, se cunosc puţine lucruri despre mecanismele patogenice care leagă blocajul catabolic de simptomele clinice ale maladiei.

Pentru a obţine informaţii asupra metabolismului gangliozidelor şi asupra aberaţiilor metabolice de la pacienţi cu gangliozidoză, s-a studiat transportul şi metabolismul ganglio-zidului GM2 radioactiv adăugat exogen în culturi de fibroblaşti din piele proveniţi de la indivizi normali şi de la pacienţi cu diferite variante de gangliozidoză GM2.

Gangliozidul GM2 a fost izolat dintr-un creier Tay-Sachs şi tritiat prin reducerea catalitică a legăturii duble din sfingozină cu borohidrură de sodiu tritiată şi purificat de impurităţile radioactive prin cromatografie. Celulele au fost cultivate cu gangliozid GM2 marcat cu ^3H după care au fost recoltate prin tripsinizare; acest tratament îndepărtează toate glicolipidele adsorbite pe suprafaţa celulară dar nu pe cele inserate în membrană, după cum s-a dovedit anterior prin studii RES. A fost studiată deasemenea încorporarea proteinei activatoare GM2 în celule cu gangliozidoză GM2, varianta AB.

Cea mai mare parte din gangliozidele tritiate legate de celule au putut fi îndepărtate prin tripsinizare, indicând că numai o mică fracţiune a fost încorporată în membrana plasmatică, restul fiind numai adsorbit, probabil la catenele carbohidrat ale glicoproteinelor. Adsorbtia de gangliozid GM2 si încorporarea sa în celule au fost practic identice în cazul fibroblaştilor de la un pacient cu gangliozidoza GM2 (varianta O) şi respectiv de la indivizi normali. Pe de altă parte, extracte din celulele normale conţineau, în plus faţă de gangliozidul GM2, un număr de produşi radioactivi cu valori R_F mai înalte. Substanţele identificate au constat din intermediari ai degradării lizozomale: GM3, LacCer, GlcCer şi Cer, precum şi o cantitate semnificativă de sfingomielină, identificată prin valoarea R_F şi prin susceptibilitatea ei la degradare cu sfingomielinază (produsul de reacţie era [^{3}H]ceramid). În celule cu gangliozidoza GM2 nu au putut fi detectaţi astfel de produşi dar au fost găsite urme dintr-o substanţă care a comigrat cu glicolipidul GA2 şi a fost hidrolizată de către ß-hexozaminidaza A în prezenţa proteinei activatoare fiziologice: produsul de reacţie a comigrat cu LacCer preparat prin acelaşi procedeu din GA2 autentic.

6.4. Diagnoza prenatală a gangliozidozei GM2

Diagnoza prenatală a gangliozidozei GM2 s-a realizat prin analiza de imunofluorescenţă a gangliozidului GM2 în amniocite de cultură prin scanning microscopic cu laser confocal (SMLC). Au fost investigati, în privinţa conţinutului de gangliozid GM2, fibroblaştii şi amniocitele.

Maladia Tay-Sachs este una dintre maladiile metabolice moştenite care cauzează vătămarea serioasă a creierului în copilărie. Incidenţa sa a fost considerată extrem de scăzută în Japonia, dar un studiu preliminar din anul 1992 pe o populaţie redusă sugerează că aceasta este aceeaşi cu cea pentru populaţia de nord-americani neevrei (adică 1:112.000) dar mai scăzută decât pentru evreii nord-americani (1:3900). Diagnoza prenatală a maladiei Tay-Sachs şi a maladiei Sandhoff au fost realizate cu succes în multe cazuri. Totuşi, diagnoza prenatală bazată numai pe determinarea enzimatică poate conduce la erori.

Deşi analiza genică este utilă pentru o diagnoză relevantă, identificarea unei gene mutante constituie condiţia necesară pentru diagnoza prenatală deoarece mutaţiile sunt eterogene în gangliozidoza GM2. Informaţia genetică nu este disponibilă în toate cazurile pentru diagnoza prenatală în momentul necesar. Proba familiei din studiul respectiv avea o substituţie a bazei (AG → AT) pe una dintre alele, la situsul splice-acceptor al intronului 5 pe gena pentru subunitatea α,

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

ducând la omiterea exonului 6. Informaţii despre alte alele nu sunt disponibile în prezent. Acest genotip a fost confirmat, după ce fetusul a fost avortat, prin activitatea hexozaminidazei A extrem de redusă. S-a relatat prezenţa GM2 şi a asialo-derivatului său în tulpini de fibroblaşti de la pacienţi Tay-Sachs. Conţinutul în amestec de GM2 şi GM3 în aceste celule era de 2-4,5 ori mai înalt decât în celule normale, dar metodele analitice (CGL) utilizate necesită un mai mare număr de celule şi mai mult timp.

Pentru a învinge dezavantajele tehnice inerente în diagnoza prenatală, s-a încercat analiza microscopică în imunofluorescenţă a GM2 depozitat în fibroblaşti şi amniocite Tay-Sachs prin colorare cu un anticorp monoclonal anti-GM2 cu înaltă specificitate . Celulele nu mai prezentau fluorescenţă după delipidare cu cloroform-metanol-apă. Acest rezultat indică faptul că gangliozidul GM2 şi nu glicoproteinele se acumulează în celulele de cultură Tay-Sachs. Sistemul SMLC a fost utilizat şi în alte domenii ale biologiei, cum ar fi microtomografia *in situ* în morfologia subcelulară tridimensională, şi s-a dovedit avantajoasă pentru detectarea de mici cantităţi de compuşi, datorită iluminării cu focusare înaltă şi iluminării intense cu sursă punctiformă, precum şi reconstrucţiei cu ajutorul calculatorului a imaginilor fine de nivel celular. Analiza SMLC a demonstrat cu claritate acumularea granulară de GM2 în fibroblaşti şi amniocite Tay-Sachs.

Gangliozidoza GM2 cuprinde un grup de maladii lizozomale moştenite cauzate de acumularea excesivă a gangliozidului GM2, îndeosebi în SNC. Ele provin de la un defect al hexozaminidazei A sau al proteinei activatoare GM2. Prima este compusă din subunităţi α şi ß codificate de gene de pe cromozomii 15 şi respectiv 5, iar ultima de către o genă de pe cromozomul 5. Mutaţii în oricare dintre ele perturbă catabolismul gangliozidului GM2 ducând la maladia Tay-Sachs prin deficienţă în hexozamindaza A (mutaţie în subunitatea α), maladia Sandhoff prin deficienţe în hexozaminidazele A şi B (mutaţie în subunitatea ß) sau varianta AB prin deficienţa activatorului GM2.

Pentru diagnoza prenatală au fost folosite următoarele: vili corionici, fluid amniotic, amniocite native sau amniocite cultivate. Hexozaminidaza A a fost dozată cu substrate artificiale însă diagnosticarea enzimatică nu este întotdeauna simplă, îndeosebi pentru homozigoţi cu o anumită activitate enzimatică reziduală sau pentru heterozigoţi cu activitate relativ joasă. În plus, diagnoza prenatală a deficienţei activatorului GM2 necesită o determinare cantitativă a acestei proteine sau evaluarea degradării GM2 intracelular. Aceste procedee sunt consumatoare de timp şi nu sunt folosite de obicei. Într-un studiu a fost evaluat GM2 imunoreactiv în culturi de amniocite de la un fetus cu maladia Tay-Sachs, prin metoda SMLC.

Au fost comparate amniocitele de la un fetus riscant şi un fetus de control, ambii obţinuţi în a 14-a săptămână de sarcină. Au fost studiaţi deasemenea fibroblaşti de la un pacient Tay-Sachs, proba familiei respective, şi de la un subiect de control. Diagnosticarea pacientului s-a realizat pe baza manifestărilor clinice şi a rezultatelor enzimatice pentru leucocite periferice. Activitatea hexozaminidazei A a fost determinată cu 4-metilumbeliferil (4MU) ß-D-N-acetilglucozamin-6-sulfat, ca substrat, conform cu metoda recomandată de producător. Activităţile hexozaminidazei totale (îndeosebi hexozaminidazele A şi B) şi α-glucozidazei acide au fost măsurate utilizând 4MU-N-acetil-ß-D-glucozaminid şi, respectiv, 4MU-α-D-glucozid, ca substrate. A fost utilizat un anticorp monoclonal IgM de şoarece anti-GM2, cu înaltă specificitate pentru GM2 şi care nu reacţionează cu alte gangliozide sau glicolipide neutre. În urma cultivării, celulele au fost fixate cu paraformaldehidă în PBS iar după ce soluţia de fixare a fost îndepărtată, ele au fost tratate cu anticorp timp de 1 h, spălate cu PBS şi apoi tratate cu IgM $F(ab')_2$ de capră anti-şoarece conjugată cu FITC (fluorescein izotiocianat). Celulele tratate astfel au fost examinate, atât în contrast de faza cât şi în fluorescenţă, cu un sistem scanning de imagine ataşat la microscop şi un sistem de calculator dotat cu informaţie pentru analiza standard a imaginii. Imunoreacţia între GM2 şi anticorpul monoclonal anti-GM2 este dependentă de doză, după cum

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

s-a confirmat prin testul ELISA utilizând IgM de capră anti-şoarece FITC-conjugată ca anticorp secund, în loc de IgM conjugată cu peroxidază din hrean. Datele de imagine au fost încorporate şi calculate automat de către computer la scurt timp după scanning.

Intensitatea fluorescenţei incluziunilor celulare a fost destul de înaltă pentru a putea fi distinsă de intensitatea fondului. Celulele conţinând numeroase incluzii fluorescente granulare au fost desemnate ca celule pozitive. Valoarea absolută a intensităţii fluorescenţei a fost variabilă în diferite experimente, dar celulele pozitive au fost discriminate cu claritate de cele negative (de control) tratate în condiţii identice. Au fost vizualizate aproximativ 500 de celule în cinci arii diferite şi s-a determinat numărul de celule pozitive.

În amniocitele individuale, o arie de fluorescenţă slabă la nivelul fondului citoplasmei a fost vizualizat ca un domeniu de culoare verde, iar o arie cu fluorescenţă puternică depăşind limita fondului a fost vizualizată ca domeniu roşu. Cantitatea relativă de GM2 în fiecare celulă a fost exprimată prin utilizarea formulei următoare:

$$\text{Indicele GM2} = \Sigma (R \times FI)/T,$$

unde R=aria domeniului roşu, FI=intensitatea fluorescenţei domeniului roşu iar T=aria totală a celulei (domeniile roşii şi verzi, însumate). Au fost vizualizate la întâmplare 60 de celule în trei arii diferite, după care au fost calculaţi indicii GM2.

S-a găsit că activitatea hexozaminidazei A era mult scăzută în amniocitele provenite de la fetusul riscant (15 nmol/mg proteină/h; control, 574 nmol/mg proteină/h), fiind la acelaşi nivel ca în fibroblaştii proveniţi de la sora mai mare a pacientului (19 nmoli/mg proteină/h; control, 328 nmol/mg proteină/h); valorile celor doi pacienţi au reprezentat 3% şi, respectiv, 6% din valorile controlului. Activităţile hexozaminidazei totale şi α-glucozidazei acide erau normale la aceste tulpini celulare. În felul acesta diagnoza maladiei Tay-Sachs la fetusul respectiv a fost confirmată. Numeric, celulele pozitive erau peste 95% la amniocitele Tay-Sachs şi mai puţin de 30% la celulele de control.

Analiza imaginii digitale a celulelor Tay-Sachs a arătat o intensitate puternică a fluorescenţei în citoplasmă, acolo existând numeroase domenii roşii; celulele de control au prezentat numai câteva domenii roşii. Indicele GM2 a fost de 34,3 ± 1,8 (media ± D. S.; n=3) pentru amniocite Tay-Sachs şi 4,6 ± 1,0 (n=3) pentru celulele de control.

Cu ajutorul sistemului de mai sus, au putut fi distinse celulele normale şi patologice atât prin numărarea celulelor fluorescent-pozitive cât şi prin analiza imaginii digitale. Procedeul este uşor, rapid şi necesită un număr mic de celule, în comparaţie cu cuantificarea biochimică a GM2. Se poate trage concluzia că acest sistem poate fi aplicat pentru diagnoza prenatală de încredere a gangliozidozelor GM2, inclusiv a deficienţei de activator GM2, în combinaţie cu alte procedee convenţionale de diagnosticare. În plus, permite obţinerea de imagini optice excelente atât pentru biologia de bază cât şi pentru cercetarea clinică.

6.5. Selectivitatea biologiei mediate de ceramide.

Sfingolipidele joacă un rol central în recunoaşterea celulară, modularea creşterii şi diferenţierii celulare, contactul celulă-celulă şi alte funcţii ale membranelor. Ceramidul este un mesager secund care mediază efectele agenţilor extracelulari asupra creşterii şi diferenţierii celulare (T. Okazaki şi colab., 1990) şi asupra morţii celulare programate (L. Obeid şi colab., 1993). În vederea unor studii au fost sintetizaţi patru izomeri ai C2-ceramidului şi patru ai dihidroceramidului şi a fost investigată activitatea lor celulară. Cei patru stereoizomeri ai C2-ceramidului au fost activi în inhibiţia creşterii celulare şi inducţiei apoptozei cu mici diferenţe ale potenţialului biologic. Pe de altă parte, în cazul C2-dihidroceramidelor au fost activi numai compuşii *treo* iar compuşii *eritro* au fost total inactivi. Astfel, din cele două tipuri de molecule

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

existente în natură, analogul D-*eritro*-ceramidului (cu legătură dublă 4-5 trans) a fost activ, pe când analogul D-*eritro*-dihidro-ceramidului a fost inactiv. Aceste rezultate demonstrează specificitatea acţiunii ceramidului şi sugerează că introducerea legăturii duble este o etapă critică pentru a conferi ceramidului activitate biochimică şi biologică.

Descoperirea inhibiţiei PKC de către sfingozină (Y. A. Hannun şi colab., 1986) şi de către lizosfingolipide (Y. A. Hannun şi A. M. Bell, 1987) a dus la ipoteza că sfingolipidele joacă un rol în transducţia semnalului şi sunt precursori ai mediatorilor celulari bioactivi. Investigarea acestei ipoteze a dus la descoperirea ciclului sfingomielinei, prin care o diversitate de agenţi extracelulari activează o sfingomielinază neutră ducând la hidroliza sfingomielinei şi formarea fosforilcolinei şi ceramidului. Astfel de agenţi extracelulari sunt: 1α,25-dihidroxivitamina D3, TNFα, γ-interferonul şi interleukina 1. Rolul ceramidului în medierea unor activităţi ale acestor agenţi extracelulari a fost dovedit prin utilizarea ceramidelor permeabile pentru celulă, despre care s-a găsit că induc diferenţierea celulelor leucemice, inhibiţia creşterii celulare, reglarea negativă a protooncogenei c-*myc* şi modularea fosforilării proteinelor celulare.

Alte studii au demonstrat capacitatea C2-ceramidului de a induce fragmentarea ADN sugerând un rol pentru ceramid ca mediator al apoptozei. Prin urmare ceramidul este un reglator important al creşterii celulare, viabilităţii şi diferenţierii. Capacitatea ceramidului de a inhiba creşterea celulelor de *S. cerevisiae* sugerează conservarea acestei căi de reglare metabolică în cursul evoluţiei. Stabilirea rolului ceramidului în reglarea celulară constă în clarificarea următoarelor aspecte: mecanismul de acţiune al Cer, găsirea ţintei moleculare proximale a Cer, specificitatea structurală de acţiune a Cer. Încercarea de a identifica ţinta moleculară de acţiune a Cer a dus la identificarea protein fosfatazei activată de ceramid ca ţintă *in vitro* pentru acesta.

Cerinţele structurale şi stereospecifice pentru efectele ceramidului asupra celulelor HL-60 au fost evaluate prin utilizarea analogilor N-acil-fenil-amino alcool.

Studiile respective au dovedit că lanţul acil legat ca amidă este necesar pentru activitate şi a fost evidenţiată stereospecificitatea de acţiune: D-*eritro*-2-(N-miristoil-amino)-1-fenil-1-propanol (D-e-MAPP) este activ în timp ce izomerul sau L-e-MAPP este inactiv. Deosebirea dintre cei doi compuşi nu a fost corelată cu modul lor de absorbţie, sugerând că activitatea lor celulară este specifică. Studiile de acest fel au fost continuate prin cercetarea efectelor celor opt izomeri ai C2-ceramidului şi C2-dihidroceramidului asupra creşterii celulare şi asupra morţii celulare programate.

Efectele celor patru stereoizomeri ai C2-ceramidului asupra proliferării celulare a fost evaluată prin tratarea celulelor HL-60 cu compusul respectiv; s-a observat o inhibiţie a creşterii celulare dependentă de doză. A rezultat totodată următoarea ordine a intensităţii acţiunii, pentru ceramide: L-*treo*-C2 > D-*eritro*-C2 = L-*eritro*-C2 > D-*treo*-C2. Studii similare pe dihidroceramidele corespunzătoare au relevat următoarele: *treo*-C2-dihidro-ceramidul inhibă creşterea celulară echipotent cu C2-ceramidul. *Eritro*-C2-dihidroceramidul este, practic, inactiv. Cercetări ulterioare au arătat că atât D-*treo*-C2-dihidroceramidul cât şi L-*treo*-C2-dihidroceramidul sunt inhibitori de creştere pentru celulele HL-60, în timp ce ambii enatiomeri *eritro*-C2-dihidroceramid sunt inactivi. Rezultatul este important dacă se ia în considerare faptul că D-*eritro*-ceramidul şi D-*eritro*-dihidroceramidul sunt ceramidele predominante în natură.

Cu creşterea concentraţiei ceramidelor s-a observat o creştere a cantităţii absolute de compus internalizat de celule dar proporţia absorbită a scăzut cu creşterea concentraţiei. Investigarea rolului ceramidului ca mediator al activităţii antiproliferative şi acţiunii citotoxice a ceramidului au arătat că Cer este un inductor potenţial al apoptozei la celulele U937, după cum s-a evaluat prin capacitatea C2-ceramidului de a induce fragmentarea ADN intranucleosomal. C2-ceramidul a fost activ iar dihidro-C2-ceramidul nu a fost activ.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

6.6. Evidenţierea a două situsuri active diferite pe ß-hexozaminidaza umană

ß-Hexozaminidazele lizozomale umane (ß-N-acetil-D-hexozaminidaza, EC 3.2.1.52) sunt alcătuite din două subunităţi diferite, α şi ß. Dimerizarea precursorilor de subunităţi dă naştere la izoenzimele ß-hexozaminidaza S (αα), ß-hexozaminidaza A (αß) şi ß-hexozaminidaza B (ßß) care sunt prelucrate în continuare prin hidroliză proteolitică limitată. Hexozaminidaza A este singura izoenzimă capabilă să hidrolizeze toate substratele cunoscute ale ß-hexozaminidazei. O pierdere totală a activităţii hexozaminidazei A datorită unei mutaţii în subunitatea α sau ß, ducând la ineficienţa enzimei rezultate prin asociere încrucişată, cauzează formele infantile de gangliozidoze GM2. În varianta B, deficienţa subunităţii α determină lipsa ß-hexozaminidazelor A şi S, în timp ce activitatea ß-hexozaminidazei B este normală. În varianta O, mutaţia subunităţii ß cauzează dispariţia ß-hexozaminidazelor A şi B, în timp ce ß-hexozaminidaza S este încă prezentă. Activitatea ß-hexozaminidazei faţă de cel mai important substrat natural, gangliozidul GM2, în prezenţa proteinei activatoare GM2, este redusă aproape la zero la pacienţii infantili cu ambele variante. Pe de altă parte, pacienţii cu varianta B prezintă activitate normală faţă de majoritatea substratelor sintetice acvosolubile, MU-GlcNAc, dar sunt incapabili să hidrolizeze substrate sintetice sulfatate cum ar fi p-nitrofenil-ß-D-N-acetilglucozaminil-6-sulfat. Pe de altă parte, activitatea pacienţilor cu varianta O faţă de MU-GlcNAc este mult diminuată, în timp ce activitatea sa faţă de substratul sulfatat se situează în domeniul normal. În varianta B^1 de gangliozidoză GM2, ß-hexozaminidaza A posedă o activitate aproape normală faţă de gangliozidul GM2 în prezenţa activatorului GM2 precum şi faţă de substratul sintetic sulfatat. S-a demonstrat recent că varianta B^1 este alelică cu varianta B. Din aceste rezultate a apărut ipoteza că ß-hexozaminidaza A conţine două situsuri active distincte cu specificităţi de substrat diferite, una pe subunitatea ß şi cealaltă pe subunitatea α, iar ultima ar putea fi inactivată în mod selectiv printr-o mutaţie în varianta B^1.

ß-Hexozaminidazele lizozomale umane (A, B, S) diferă mult cu privire la specificitatea lor de substrat. ß-Hexozaminidaza A are cea mai largă paletă de reactivitate; ea este capabilă să hidrolizeze toate substratele cunoscute ale ß-hexozaminidazelor. Substratele pot fi împărţite în trei grupuri diferite. În primul rând enzima eliberează N-acetilglucozamina şi N-acetilgalactozamina din legăturile ß-glicozidice terminale din substratele fiziologice cum ar fi glicopeptidele şi oligozaharidele, precum şi din resturile cromogene sau fluorogene. Această proprietate o regăsim şi la ß-hexozaminidaza B. În al doilea rând, ea clivează derivaţi sulfataţi ai N-acetilglucozaminei cum ar fi p-nitrofenil-2-deoxi-6-sulfoglucopiranozidul şi MU-GlcNAc 6-sulfatul. ß-Hexozaminidaza S este deasemenea activă faţă de acest tip de substrat, în timp ce ß-hexozaminidaza B nu este. În al treilea rând, ß-hexozaminidaza A este unică prin capacitatea ei de a hidroliza gangliozidul GM2 în prezenţa proteinei activatoare GM2 cu o viteză suficientă din punct de vedere fiziologic; ea nu poate fi înlocuită cu ß-hexozaminidaza S sau ß-hexozaminidaza B în această privinţă. Astfel, capacitatea ß-hexozaminidazelor de a cliva compuşi sintetici sulfataţi pare a fi îndeosebi o proprietate a subunităţii α, în timp ce subunitatea ß are o reactivitate mai mare faţă de substratele sintetice neîncărcate electric. Cu toate acestea nu s-a putut demonstra niciodată că aceste catene monomere α şi ß posedă o activitate enzimatică cât de mică. Pare evident că ambele tipuri de catene trebuie să se agrege corect pentru a face posibilă interacţia cu complexul gangliozid GM2/activator GM2. Compararea valorilor K_m sugerează că ß-hexozaminidazele S şi A poartă acelaşi situs activ care clivează MU-GlcNAc-6-sulfat pe subunitatea α, care nu are corespondent pe ß-hexozaminidaza B. Similar, subunitatea ß pare a fi în principal responsabilă pentru capacitatea ß-hexozaminidazei A de a hidroliza MU-GlcNAc. Experimente de competiţie demonstrează că amestecul celor două substrate nu este hidrolizat de acelaşi situs activ ci de situsuri active diferite. Printr-un experiment similar s-a demonstrat că p-nitrofenil-ß-D-GlcNAc şi p-nitrofenil-ß-D-GalNAc competiţionează pentru acelaşi situs.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Adăugarea de gangliozid GM2 şi de activator GM2 inhibă degradarea MU-GlcNAc-6-sulfat de către hexozaminidaza A în măsura prezisă de modelul total competitiv dar nu modifică viteza de hidroliză a MU-GlcNAc. Această constatare indică faptul că gangliozidul GM2 şi MU-GlcNAc-6-sulfatul sunt hidrolizate de către acelaşi situs activ de pe subunitatea α. Aceeaşi cantitate de activator GM2 fără gangliozid este mai puţin inhibitoare pentru hidroliza MU-GlcNAc-6-sulfatului. Constanta de inhibiţie a acestuia, K_i (4 μM), este de două ori mai înaltă decât constanta de inhibiţie a complexului gangliozid GM2/activator GM2 ($K_i = K_m = 1,9$ μM). Prin urmare, ß-hexozaminidaza A nu numai că recunoaşte porţiunea de gangliozid din complexul gangliozid GM2/activatorul lui GM2 dar, în plus, leagă proteina activatoare însăşi, cu afinitate diminuată în comparaţie cu activatorul complexat cu gangliozid. Deoarece hidroliza MU-GlcNAc-6-sulfatului de către ß-hexozaminidaza S este inhibată aproape în aceeaşi măsură de către proteina activatoare, legarea proteinei activatoare pare a fi o proprietate a subunităţii α mai degrabă decât a subunităţii ß. Cu toate acestea subunităţile α necesită cooperarea subunităţilor ß pentru a ataca complexul gangliozid GM2/activator GM2; ß-hexozaminidaza S este inactivă faţă de acest substrat.

Din studiile de mai sus a rezultat următoarea ipoteză: ß-hexozaminidaza A posedă două situsuri active cu specificităţi de substrat diferite. Un situs, localizat pe subunitatea ß, eliberează GlcNAc şi GalNAc din substratele sintetice şi din aproape toate substratele fiziologice, cu excepţia gangliozidului GM2. Proprietăţile sale cinetice par a fi identice cu cele ale ß-hexozaminidazei B. Subunitatea α este dotată cu un situs de legare a activatorului şi un situs activ care hidrolizează gangliozidul GM2 în prezenţa activatorului GM2 şi eliberează GlcNAc-6-sulfatul din substratele sintetice precum şi din oligozaharide derivate din keratan sulfat. Situsul de legare a activatorului şi activitatea de eliberare a GlcNAc 6-sulfatului există deasemenea în ß-hexozaminidaza S. Capacitatea de a hidroliza gangliozidul GM2 este, cu toate acestea, găsită numai la dimerul αß.

Ipoteza de mai sus este în foarte bun acord cu activităţile enzimatice reziduale observate în diferite variante ale gangliozidozei GM2. În varianta B, deficienţa subunităţii α duce la dispariţia activităţii ß-hexozaminidazelor A şi S determinând pierderea activităţii faţă de gangliozidul GM2 şi de substratele sulfatate; activitatea faţă de substratele sintetice nesulfatate, care rezidă în ß-hexozaminidaza B, este normală. În varianta O, deficienţa subunităţii ß duce la dispariţia ß-hexozaminidazelor A şi B şi este caracterizată printr-o activitate redusă faţă de gangliozidul GM2 şi compuşii sintetici nesulfataţi, în timp ce derivaţii N-acetilglucozamin-6-sulfatului sunt hidrolizaţi de către ß-hexozaminidaza S cu o viteza apropiată de cea normală. S-a demonstrat recent, prin experimente de fuziune, că pacienţii cu varianta B^1 implică o mutaţie alelică faţă de varianta B. Ei sintetizează molecule de ß-hexozaminidază A care au pierdut activitatea faţă de substratele sulfatate şi gangliozidul GM2 şi GA2 în prezenţa activatorului GM2 dar este activă în limite normale faţă de substratele sintetice nesulfatate. Această mutaţie pare să inactiveze situsul reactiv de pe catena α fără să afecteze capacitatea ei de a se combina cu subunităţi ß şi fără să scadă activitatea enzimatică a situsului ß.

6.7. Maladia Sandhoff datorată unei mutaţii punctiforme

Maladia Sandhoff este caracterizată biochimic prin activitatea descrescută a celor două izoenzime, hexozaminidaza A şi hexozaminidaza B. Deficienţa izoenzimelor prin mutaţii în subunitatea ß are ca rezultat acumularea gangliozidului GM2, îndeosebi în sistemul nervos. Acumulări similare rezultă prin mutaţii ale subunităţii α în maladia Tay-Sachs şi prin mutaţii în proteina GM2-activatorului.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Severitatea maladiei Sandhoff se corelează cu scăderea activităţii enzimatice. În formă clasică (infantilă), activitatea izoenzimelor ß-hexozaminidazei este zero, pe când în formele juvenilă şi adultă se poate detecta activitate reziduală. Au fost decelate mutaţii ale subunităţii ß, care cauzează diferite forme ale maladiei Sandhoff. Deleţia jumătăţii 5' a genei a fost constatată la una sau două alele la aproximativ 50% din pacienţii cu forma clasică, la care au fost detectate deasemenea mici mutaţii de deleţie şi mutaţii punctiforme. Mutaţii punctiforme intronice şi exonice au fost găsite în formele juvenile ale bolii.

Primul raport asupra bolii Sandhoff adulte a descris două surori cu degenerare spinocerebrală. La pacientele respective s-a demonstrat acumularea gangliozidului GM2 în SNC, ß-hexozaminidază labilă în fibroblaşti şi oligozaharide anormale în urină. A fost studiată baza moleculară a formei adulte a bolii Sandhoff. Au fost utilizaţi fibroblaşti prelevaţi din pielea pacientului şi de la voluntari sănătoşi. ADN izolat din fibroblaşti a fost incubat cu EcoR I şi Hind III. Electroforeza în gel cu inversia câmpului a fost realizată pe ADN izolat din fibroblaşti suspendaţi în agaroză şi incubat in situ cu Sfi I. Fragmentele de ADN au fost blottate şi hibridizate cu o probă de ADNc PstI de 1,6 kb a subunităţii ß din ß-hexozaminidaza umană. ARN a fost izolat din fibroblaşti, separat prin electroforeză în geluri conţinând formaldehidă, blottate şi hibridizate cu proba ADNc a subunităţii ß. ARN poliadenilat din fibroblaşti a fost izolat prin cromatografie pe oligo(dT)celuloză. ADNc a fost sintetizat şi clonat în λ gt 11. Au fost preparate subclone prin incubare cu EcoR I şi Hind III şi ligare în vectorul pGem blue. Aceste subclase şi o secvenţă localizată 5' obţinută prin PCR clonate într-o pGem blue au fost secvenţializate prin terminarea catenei dideoxi utilizând polimeraza T7 pe ambele catene de ADN. ADNc preparat din ARN poliadenilat a fost amplificat cu primeri. Clonarea în pGem blue a fost facilitată prin adăugarea situsurilor de restricţie la primeri (Hind III şi respectiv EcoR I). ADN cromozomal şi ADNc au fost amplificaţi cu primeri corespunzând secvenţelor nucleotidice 1457-1476 şi 1569-1588. Blotingurile Southern ale ADN cromozomal clivat cu EcoR I şi Hind III au fost hibridizate cu o probă de ADNc a subunităţii ß a ß-hexozaminidazei umane. Au fost preparate deasemenea blottinguri după electroforeza în gel cu inversie de câmp a ADN clivat cu Sfi I din fibroblaşti suspendaţi în agaroză. În toate cazurile modelele de restricţie a ADN de la pacient au fost similare martorilor şi nu au fost detectate deleţii.

Blottingurile Northern ale ARN din fibroblaşti de la pacient şi fibroblaşti normali au prezentat modele de hibridizare similare, în timp ce nu a fost detectat ARNm a subunităţii ß la doi pacienţi cu forma clasică a maladiei Sandhoff.

Pentru a identifica baza moleculară a defectului s-a izolat ARN poliadenilat din fibroblaştii pacientului, construindu-se o bibliotecă ADNc, şi s-au izolat clone ADNc ale subunităţii ß a ß-hexozaminidazei. Comparaţia secvenţei cu secvenţa relatată anterior a ADNc uman normal a dezvăluit o mutaţie punctiformă în poziţia 1514, cu singura deosebire privind secvenţa tipului sălbatic.

Tranziţia nucleotidică generează un non situs de restricţie pentru DdcI care poate fi folosit pentru a determina dacă mutaţia este prezentă în una sau în ambele alele . A fost amplificat ADN cromozomal al pacientului prin PCR cu primeri. Clivarea produsului PCR cu Ddc I a arătat că mutaţia este în poziţia 1514 pe una dintre alelele pacientului.

S-a demonstrat prin experimente de transfecţie că o singură mutaţie punctiformă constituie baza moleculară a labilităţii ß-hexozaminidazei în forma adultă a maladiei Sandhoff. Labilitatea enzimei fusese anterior demonstrată prin electroforeza izoenzimelor şi experimente de marcare radioactivă. Forma termolabilă provine dintr-o alelă, după cum s-a demonstrat prin amplificare şi ADNc. Pacientul este un complex genetic cu o singură mutaţie punctiformă pe una din alele, în timp ce alela cealaltă nu dă naştere la ARNm matur. Absenţa cantităţilor detectabile de ARNm de la ultima alelă poate fi cauzată de un defect de transcripţie sau prin transcripţie extrem de labilă a ARNm, dar în ambele cazuri această alelă nu contribuie la translaţia catenei ß.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Translaţia nucleotidică în poziţia 1514 este aproape de situsul de clivare al intronului 12 dar nu interferă apreciabil cu procesul de clivare al ARN deoarece a fost detectat ARNm cu lungime normală. Datele de secvenţă arată că situsurile proteolitice implicate în procesul complicat de maturare a catenei ß a ß-hexozaminidazei sunt codificate fără modificări (alterări). Cu toate acestea, mutaţia are ca rezultat o diferenţă a sarcinii electrice a proteinei deoarece Arg este substituită cu Gln. Indicele de hidropatie, determinat prin metoda lui Kyte şi Doolitle, nu este schimbat într-o măsură apreciabilă, dar o mică turnură a catenei peptidice prezisă din structura primară la legătura Pro-Arg aproape că dispare prin mutaţie. Sarcina pozitivă a Arg poate fi implicată într-o interacţie electrostatică ce stabilizează structura terţiară iar pierderea turnurii poate fi destabilizatoare. Trebuie precizat însă că structura terţiară a ß-hexozaminidazei nu este cunoscută suficient pentru a susţine aceste posibilităţi.

Importanţa mutaţiei punctiforme este ilustrată prin conservarea evolutivă a fragmentului corespunzător din secvenţa de aminoacizi. În subunitatea α, parţial omoloagă, a ß-hexozaminidazei umane, o secvenţă de 7 AA incluzând restul de Arg în discuţie, este identică cu secvenţa subunităţii ß. În subunitatea ß de şoarece, 23 AA consecutivi sunt identici cu fragmentul corespunzător uman. Chiar în mucegaiul de nămol *Dictyostelium discoideum*, Arg este conservată într-o secvenţă de 4 AA identică cu fragmentul corespunzător din subunităţile umane α şi ß.

Cunoaşterea mutaţiilor catenei ß (care se concretizează în ß-hexozaminidază labilă) este deasemenea importantă din cauza interferenţei acestor mutaţii la testele de purtător Tay-Sachs bazate pe stabilitatea termică a hexozaminidazei B normale. Amplificarea ADN cromozomal şi restricţia cu DdeI după cum a fost descrisă mai sus poate arăta dacă mutaţia Arg^{505} —>Gln este prezentă. Această substituţie ar putea fi una din multele mutaţii care generează hexozaminidaza B termolabilă, totuşi baza moleculară a altor cazuri de maladie Sandhoff adultă nu a fost încă descoperită. La două persoane asimptomatice cu aproximativ 10% de activitate hexozaminidazică A (din cea normală) dar cu activitatea hexozaminidazică B lipsind cu totul, o secvenţă duplicată care răsuceşte marginea intronului 13 şi exonului 14 a avut ca rezultat o inserţie în cadru de 18 nucleotide. Au fost găsite substituţii intronice şi exonice punctiforme în formele juvenile ale maladiei Sandhoff. O tranziţie G —>A a fost detectată în intronul 12 cu o inserţie *in-frame* de 24 nucleotide, care împiedică plierea corectă şi procesarea catenei ß. O formă juvenilă prezentată clinic ca o maladie a neuronului motor s-a arătat a fi un compus genetic cu o mutaţie punctiformă exonică ducând la substituţia Ile^{207}—>Val şi Tyr^{456}—>Ser, ambele în regiuni cu înaltă conservare a catenei ß. Imunoprecipitarea izoenzimelor a arătat absenţa hexozaminidazei B şi prezenţa hexozaminidazei A. Autorii au propus că aceste mutaţii punctiforme interferă cu autoasocierea catenelor ß. Totodată, aceste rezultate pot fi explicate deasemenea prin degradarea rapidă a dimerilor ß-ß. Aceeaşi explicaţie este aplicabilă în anumite cazuri mutaţiilor în catena α, care împiedică asocierea.

Imunoprecipitarea hexozaminidazei de la pacienţii descrişi mai sus poate fi deasemenea explicată fie prin asocierea defectă sau prin degradarea rapidă. Măsurări de activitate enzimatică şi electroforeza izoenzimelor, precum şi experimentele de transfecţie, demonstrează că asocierea catenelor ß are loc şi ca hexozaminidaza mutantă este termolabilă.

Aceşti pacienţi cu maladia Sandhoff adultă combină mutaţia Arg^{505} —>Gln cu o alelă nulă. Compuşii genetici sunt de aşteptat printre formele juvenilă şi adultă a maladiei Sandhoff dacă se are în vedere incidenţa înaltă a mutaţiilor clasice în populaţia umană. Pentru acelaşi motiv, compuşii genetici vor apărea frecvent printre formele juvenilă şi adultă a multor alte maladii recesive (P. A. Bolhuis şi colab., 1993).

Secvenţele de aminoacizi ale proteinei activatoare GM2 şi ale proteinei activatoare a cerebrozid sulfatului au fost stabilite prin degradarea Edman.

Proteina activatoare a gangliozidului GM2. Proteina activatoare a gangliozidului GM2, de provenienţă umană, constă din 162 AA. Primele două resturi de serină sunt prezente în numai

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

20% din material. Prezența unei catene carbohidrat (N-linkată) pe Asn32 a fost demonstrată prin deglicozilarea activatorului GM2 cu glicopeptidaza F înaintea degradării cu BrCN, s-a găsit astfel, în poziția corespunzătoare, acid aspartic. Capătul C-terminal al proteinei activatoare constă din Met161-Ser162; acest rezultat este remarcabil deoarece secvența cADN a activatorului GM2 a relevat Gly și Ile la capătul C-terminal. Deoarece erorile de secvențializare nu pot explica înlocuirea Met-Ser cu Gly-Ile iar pe de altă parte nu a fost găsită nici o clonă cADN corespunzătoare datelor pe proteină, această discrepanță nu poate fi rezolvată pe moment. Se speră că elucidarea structurii genomice ar putea oferi o explicație.

Secvența cADN a relevat, în locul Met38, Val. Această diferență se datorează probabil polimorfismului. Ulterior a fost găsită o altă clonă de ADNc care prezintă tripletul ATG (care codifică Met) în loc de GTG (care codifică Val), în poziția respectivă.

Proteina activatoare a gangliozidului GM2 conține un segment hidrofob extins, între AA 15-90. Trei spirale în această regiune prezintă un caracter amfifil evident și ar putea fi implicate în formarea cavității de legare a lipidelor. Cercetarea pe computer a bazelor de date referitoare la secvența proteică, utilizând algoritmul FASTP nu a dus la găsirea unei proteine similare proteinei activatoare GM2. A fost deplin exclusă posibilitatea înrudirii activatorului GM2 cu activatorul cerebrozid sulfat sau cu alți derivați din proteina precursoare. Chiar profilul hidropatiei și structura secundară sunt total diferite de ale activatorului cerebrozid sulfatului.

Structura unică a proteinei activatoare GM2 poate reflecta o funcție unică. Ea interacționează specific cu hexozaminidaza A, în contact cu proteina activatoare a cerebrozid sulfatului care pare a stimula clivarea a diferite sfingolipide prin simpla lor dizolvare.

Activatorul cerebrozid sulfatului. Activatorul CS este format din 80 AA. Restul Val la capătul C-terminal a fost găsit la numai 20% din material. După hidroliza cu glicopeptidaza F, a fost găsit un rest de Asp în locul unei lacune în poziția 21 indicând prezența unei catene carbohidrat N-linkate, în acea poziție. Secvența proteică este coliniară cu secvența ADNc a activatorului CS. Totuși, inserția a trei AA (Gln-Asp-Gln) după Met65, care a fost găsită în mai multe ADNc, nu a fost observată în secvența proteică. Pe moment sensul acestei inserțiuni rămâne neclar.

6.8. Glicosfingolipide din tumori

Expresia glicoconjugatelor care conțin AS este specifică țesutului, reglată de cursul dezvoltării și prezintă o distribuție regională într-o varietate de țesuturi; în anumite cazuri glicoconjugatele respective apar ca antigeni oncofetali. Expresia selectivă a O-Ac-GD3 se realizează la glanda suprarenală în stadiul embrionar, mezonefros și anumite regiuni ale sistemului nervos în cursul dezvoltării, dar nu în alte organe ale fetusului. Studii cu anticorpul monoclonal JONES au demonstrat că acest gangliozid neobișnuit prezintă un gradient dorso-ventral pe direcția transversală a retinei în dezvoltare; această distribuție este distinctă de a precursorului GD3. O discordanță similară între GD3 și O-Ac-GD3 a fost găsită și în alte zone ale sistemului nervos central și periferic.

Există dovezi că O-Ac-GD3 exprimat în melanom uman este un potențial antigen asociat melanomului și constituie o țintă promițătoare pentru imunoterapia melanoamelor. S-a relatat că melanomul de hamster conține GM3, GD3 și O-Ac-GD3 ca gangliozide majore, o paletă similară celei exprimate în anumite melanoame umane. Expresia O-Ac-GD3 în celulele melanoma ar putea servi unui proces de modulare și selectivitate în evenimentele critice care sunt creșterea și metastaza celulară.

Au fost utilizate melanoame melanotice Bomirski Ma care au fost implantate subcutan la hamsterii aurii. Țesuturile de melanom au fost disecate, eliberate de țesuturi necrotice și conective, spălate cu PBS și omogenate în apă. Lipidele totale au fost extrase cu cloroform:metanol 2:1 prin agitare peste noapte. După filtrare, reziduul a fost reextras cu

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

cloroform-metanol 1:2 şi cloroform-metanol-apă, 30:60:8 prin agitare timp de două ore pentru fiecare extract. Extractele lipidice amestecate au fost cromatografiate pe DEAE-Sephadex A-25. Fracţiunile de mono-, di-, şi polisialogangliozide au fost evaporate la sec şi dializate faţă de apă distilată timp de două zile pentru a îndepărta sărurile. A urmat cromatografia pe Iatrobeads; verificarea purităţii s-a realizat prin CSS.

Din ţesuturi melanoma de hamster au fost purificate trei gangliozide, A, B, C, care au comigrat respectiv cu GM3, GD3 şi O-Ac-GD3 din lapte bovin; cele trei gangliozide dau procente de 49%, 35% şi 16% din AS total. Spectrele SM-BAR au arătat următoarele. Gangliozidul A (GM3) a prezentat patru grupuri de ioni, iar gangliozidele B (GD3) şi C (O-Ac-GD3) prezintă cinci grupuri de ioni care provin din ceramide şi poliglicozil-ceramide. În SM al lui GM3 ionii moleculari proeminenţi $[M+Na-2H]^-$ cu valorile m/z 1151, 1179, 1207, 1235 şi 1263 dau informaţii asupra MM a speciilor de GM3 care conţin C-18-Sph şi, respectiv AG C16:0, C18:0, C20:0, C22:0 şi respectiv C24:0. Aceşti ioni sunt deasemenea prezenţi în spectrele gangliozidelor GD3 şi O-Ac-GD3. Dar ionii cvasimoleculari pentru GD3 şi O-Ac-GD3 sunt deplasaţi cu 313 şi 355 unităţi de masă, în comparaţie cu cei observaţi pentru GM3; aceasta sugerează prezenţa unui rest de AS suplimentar si, respectiv, un rest suplimentar de AS monoacetilat. De ex ionii cu m/z 1540, 1568 şi 1596 din O-Ac-GD3 corespund gangliozidului GD3 monoacetilat care conţine C18-sfingozină şi, respectiv, AG C20:0, C22:0 şi C24:0; valorile 1562, 1590 şi 1618 corespund ionilor quasi-moleculari $[M+Na-2H]^-$. Fragmentele ionice corespunzătoare eliminării unei grupări acetil şi unei unităţi de acid O-acetil sialic din ionii moleculari O-Ac-GD3 sunt detectate la m/z 1498, 1526, 1554, 1207, 1235, 1263. Ionii 916, 944, 972, 754, 782, 810, 592, 620 şi 648 sunt ceramid dihexozid, ceramid monohexozid şi, respectiv, ceramid. Prezenţa ionilor cu m/z 1207, 1235 şi 1263 în O-Ac-GD3, identici cu ionii gangliozidului GM3, arată că gruparea O-acetil este ataşată de restul de AS terminal al moleculei. Oxidarea comparativă cu periodat a arătat că gangliozidul O-Ac-GD3 dă aceeaşi cantitate de formaldehidă, un mol/mol, ca gangliozidul GD3. Deoarece 8-O-Ac- şi 8,9-O-di-Ac-GD3 nu sunt oxidate, datorita lipsei grupărilor hidroxil vicinale în catena laterală glicerol, iar 9-O-Ac-GD3 nu dă formaldehidă la oxidare, înseamnă că gruparea O-acetil este localizată în poziţia 7 a AS terminal.

Pentru a confirma poziţia de substituţie a grupării O-Ac pe AS terminal, proba acetilată a fost analizată prin RMN protonică. Prezenţa unei rezonanţe protonice cu o scindare minoră (1,5 Hz) în jurul valorii 4,16 ppm sugerează prezenţa substituţiei O-Ac în poziţia 7 a AS terminal. Absenţa unei rezonanţe la 4,82 ppm indică cu claritate absenţa substituţiei O-Ac din poziţia 9 a restului de AS. Rezonanţele protonului H-3e a resturilor de AS intern şi terminal au valorile 2,35 şi, respectiv, 2,70 ppm. Rezonanţele grupărilor N-Ac ale celor două resturi α-NeuAc au valorile 1,88 şi 1,89 ppm. Un singlet suplimentar la 2,01 ppm a fost atribuit protonilor metilici O-Ac. Prin corelarea datelor obţinute prin RMN protonică cu CSS de înaltă performanţă, cu oxidarea cu periodat, cu spectrometria de masă şi analiza GC, a rezultat că structura gangliozidului acetilat din melanom de hamster este următoarea: Ac-O-7NeuAcα8NeuAcα2-3Galß1-4Glcß1-1'Cer. Analiza compoziţională a celor trei gangliozide este prezentată în Tabelul 63.

Tabelul 63.Compoziţia în AG a gangliozidelor izolate din melanom Bomirski Ma.

Acid gras	Gangliozid		
	GM3	GD3	O-Ac-GD3
C16:0	3,5	3,8	10,9
C18:1	ur	1,6	4,7

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

C18:0	2,2	12,5	17,2
C20:0	9,5	12,3	11,3
C21:0	ur	ur	ur
C22:1	ur	ur	ur
C22:0	31,5	29,6	25,3
C23:0	8,4	1,4	ur
C24:1	7,9	10,8	7,0
C24:0	36,5	27,3	21,8

Sialil Lewis X a fost descoperit prima oară în rinichi uman (H. Rauvala, 1976). Ulterior s-a constatat că acest compus este foarte răspândit ca antigen gangliozidic în tumori (sau asociat tumorilor) (K. Fukushima şi colab., 1984). S-a demonstrat apoi, în cadrul mecanismelor moleculare şi celulare de acţiune ale acestui compus, că molecula-1 de adeziune endotelială a leucocitelor (ELAM-1) recunoaşte determinantul sialil Lewis X, Neu5Acα2-3Galß1-4(Fucα1-3)GlcNAc-, care se găseşte ca structură carbohidrat terminală atât în glicolipide cât şi în glicoproteine (G. Walz şi colab., 1990; M. L. Phillips şi colab., 1990; J. B. Lowe şi colab., 1990) Legarea celulelor mieloide la ELAM-1 solubilă este inhibată de către un anticorp monoclonal care recunoaşte sialil Lewis X sau proteinele purtătoare de sialil Lewis X. Prin urmare carbohidraţii sunt capabili de a bloca atacul celulelor albe asupra receptorilor ELAM-1, reducând prin aceasta inflamaţia.

Oligozaharidele cu determinantul Le^X (Galß1-4(Fucα1-3)GlcNAc) se acumulează în mari cantităţi în diferite adenocarcinoame. Anticorpii monoclonali care recunosc Le^X mono-, di-, şi trimeric au prezentat o colorare preferenţială în stadiile specifice ale ţesuturilor fetale şi în diferite adenocarcinoame umane. Astfel, aceşti epitopi carbohidrat sunt antigeni tipici ai onco dezvoltării. În consecinţă, a fost investigată prezenţa epitopului Le^X în serul indivizilor normali şi al pacienţilor cu cancer prin utilizarea a doi AcM cu afinitate înaltă, SH1 şi SH2, direcţionaţi respectiv faţă de structuri Le^X mono- şi dimer. S-a găsit că antigenul Le^X din ser, determinat prin utilizarea anticorpului monoclonal SH1, este situat pe o glicoproteină cu MM 200.000 (gel-filtrare). Antigenul Le^X era prezent la majoritatea (85%) în serul pacienţilor cu adenocarcinom. Deşi epitopul Le^X era detectat în serul normal la 33% din indivizii normali, nivelul său era semnificativ mai scăzut decât în serul pacienţilor bolnavi de cancer. Cercetătorii s-au servit apoi de o imunodeterminare dublă în fază solidă utilizând SH2 ca anticorp de captare iar SH1 ca anticorp de detectare, ceea ce a permis determinarea directă a nivelului Le^X din ser. Prin această metodă s-a constatat că nivelul Le^X din ser creşte odată cu evoluţia cancerului colorectal. Totodată, nivelul Le^X din ser a avut valoare de pronostic în cazul pacienţilor operaţi, în etapa postoperatorie.

Retinoblastoma este o tumoare cu frecvenţă scăzută, cu localizare intraoculară, care apare la copii înaintea vârstei de 4 ani. Acest tip de cancer de origine neuroectodermală este de regulă ereditar şi s-a demonstrat că este determinat genetic. Diagnosticarea retinoblastomei se bazează încă pe examinarea clinică astfel că nu există încă o metodă precisă de diagnostic. Tentativa de a găsi markeri circulanţi pentru această maladie a dus la gangliozide. Pentru aceasta au fost analizate gangliozidele din tumori de retinoblastomă. Paleta de gangliozide din acest ţesut conţine: GM3, GM2, GM1, GD3, GD2, GD1b şi GT1b ca şi componente majore. S-a găsit o concentraţie înaltă de GD2 în acest tip de tumori, ceea ce a dus la ipoteza că ar putea exista schimbări ale nivelului GD2 în serul pacienţilor cu retinoblastoma. Au fost realizate investigaţii prin imunocolorare cantitativă cu anticorpi monoclonali de şobolan specifici pentru GD2. La 9 din 10 pacienţi purtători de tumori nivelul gangliozidului GD2 din ser a fost semnificativ mai înalt decât valoarea medie găsită la indivizii normali. Un studiu pe 2 ani asupra pacienţilor a

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

arătat că tratamentul eficace a avut ca rezultat descreşterea rapidă a nivelului GD2 din ser la o valoare mai scăzută chiar decât cea normală; după aceea s-a observat o creştere ulterioară numai la pacienţii cu recidivă. Aceste rezultate sugerează că GD2 este dispersat în serul pacienţilor purtători de tumori şi că nivelul GD2 ar putea fi un marker potenţial al serului în cazul retinoblastomei umane (J. Portoukalian şi colab., 1993).

Au fost studiate neuroblastoame de la copii care prezintă tumori la diferite vârste şi cu diferite localizări primare: abdominale, suprarenale, pelvice, toracice. Analiza modelului gangliozidelor a 53 de tumori a indicat că pacienţii care prezentau testul pozitiv al maladiei la doi ani după intervenţia chirurgicală sau căzuseră victime maladiei aveau , semnificativ, mai puţin GT1b şi GD1b decât tumorile de la pacienţii care se vindecaseră la doi ani după operaţia chirurgicală. Prezenţa lui GD2 în 45 de tumori s-a corelat bine cu ideea că acesta poate fi utilizat ca marker în diagnosticul neuroblastomei. Copiii cu neuroblastoma toracică au prezentat o prognoză semnificativ mai bună decât copiii cu tumori în alte poziţii anatomice. Analiza compoziţiei în gangliozide a acestor tumori a indicat că acestea aveau o concentraţie semnificativ mai înaltă de GT1b si GD1b şi o concentraţie semnificativ mai scăzută de monosialogangliozide decât tumorile provenite de la pacienţi care nu supravieţuiseră sau la care maladia era persistentă. Aceste rezultate sugerează că nivele joase de GT1b şi GD1b se corelează cu o prognoză slabă. Neuroblastoamele toracice pot fi alcătuite din mai multe celule neuroblastoma diferenţiate (paleta gangliozidelor este mai asemănătoare cu a SNC) iar aceasta ar putea contribui la faptul că 85% din copiii cu neuroblastoma toracică au fost recuperaţi. De notat că paleta de gangliozide poate servi ca indicator de pronostic pentru neuroblastoma deoarece gangliozidele au un rol specific în diferenţierea neuronală.

Gangliozidul GD2 este un disialogangliozid care constituie <10% din conţinutul total de gangliozide al sistemului nervos dar este exprimat intens într-o varietate de tumori, ca de ex: osteosarcoma, melanoma, astrocitoma, sarcoma tesutului moale, cancerul de plămân al celulelor mici şi neuroblastoma. Neuroblastoma este o tumoare solidă extracranială, frecvent întâlnită la copii, de obicei înaintea vârstei de trei ani, care se prezintă sub forma unei excrescenţe abdominale ce ia naştere din medulosuprarenală sau din ganglionii simpatici paraspinali. Tumorile tind să se disemineze timpuriu, cu toate că combinarea chemoterapiei, iradierii şi metodelor chirurgicale pot determina un regres al tumorilor, pacienţii devin în scurt timp refractari la tratament. Modalităţile de tratament s-au îmbunătăţit puţin în ultimele două decenii. Concentraţia înaltă a gangliozidului GD2 în neuroblastomă (5-10 x 10^6 molecule per celulă) a determinat cercetătorii să investigheze potenţialul său ca valoare diagnostică şi ca valoare terapeutică. Nivelul GD2 din plasmă a fost utilizat pentru a monitoriza progresul maladiei în timp ce anticorpii monoclonali 3F8 anti-GD2 de şoarece au fost utilizaţi în diagnosticarea imunohistochimică şi în detecţia radioimunoscintigrafică a maladiei. S-a studiat distribuţia GD2 într-o serie de tumori neuroblastoma prin utilizarea acestor anticorpi monoclonali care recunosc epitopul GD2. Rezultatele sunt următoarele: din 39 cazuri de neuroblastoma 38 au prezentat imunoreactivitate puternică cu 3A7 şi 3F8, în timp ce medulara suprarenala normală nu a prezentat nici o dovadă a expresiei lui GD2 iar ganglionii simpatici s-au colorat numai cu 3F8. Din cele 39 tumori, 11 au fost considerate neuroblastoame în diferenţiere, datorită prezenţei a mai mult de 5% celule în maturare. Modelul de colorare cu 3F8 şi 3A7 era similar în 24 de cazuri, şi anume reactivitate difuză a citoplasmei celulei tumorale şi, dacă era prezent , a neuropilului asociat. Anticorpul monoclonal 3F8 a produs un model de colorare granular fin pe când cel cu 3A7 era rugos. Un caz din cele 39 a prezentat reactivitate tumorală minimă cu 3F8 şi slab pozitivă cu 3A7; cu toate acestea un grup de celule tumorale din ţesutul moale adiacent s-a colorat puternic pentru GD2 sugerând că alte zone ale tumorii exprimă GD2 . Colorarea anormală în acest caz a fost atribuită eterogenităţii celulare a tumorii şi a apărut probabil prin expansiunea clonală a unei celule metastatice care nu exprimă GD2.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Linia celulară glioma RG2 de şobolan este o linie celulară indusă cu N-etil-nitrozo-uree, derivată din şobolani Fisher. Celulele glioma RG2 au fost implantate subcutan la şobolani Fischer, iar din tumori au fost extrase şi purificate glicolipidele. A fost izolat un GSL, aparţinând seriei ganglio, cu activitate de grup sanguin uman B. GSL a fost caracterizat prin spectrometrie RMN, SM-BAR negativă, degradare secvenţială cu glicozidaze şi analiză de metilare. S-a conchis că structura GSL este Galα1-3(Fucα1-2)Gg4Cer. Antigenicitatea de grup sanguin uman B şi activitatea acestui GSL au fost confirmate prin imunocolorare pe placă CSS şi respectiv inhibiţia hemaglutinării. Antigenicitatea GSL purificat din sursa de mai sus a fost estimată într-un studiu imunologic pe CSS utilizând un anticorp monoclonal anti-glucidele B-active. GSL s-a colorat puternic cu anticorpul monoclonal anti-B în timp ce GSL active din eritrocite umane erau nereactive. Un studiu imunologic suplimentar prin hemaglutinare cu celule roşii tip B a arătat inhibiţie.

Gangliozidele sunt antigeni asociaţi melanomului uman. De ex. gangliozidul GD^3, care este gangliozidul major prezent în culturi de melanoma uman şi în tumori de melanoma solide s-a dovedit a fi un marker tumoral util. În plus, în lumina importanţei expresiei intense a antigenilor de suprafaţă celulară în cadrul citotoxicităţii mediate de macrofage şi dependentă de antigen, gangliozidul GD3, precum şi alte gangliozide asociate melanomului, par a fi ţinte promiţătoare pentru imunoterapia acestuia. A fost generat un anticorp monoclonal, ME311, de către şoareci imunizaţi cu celule de melanoma uman, care detectează un gangliozid O-acetilat, înrudit cu GD3 dar unic ca antigen.

A fost studiată reactivitatea anticorpului monoclonal ME311 (IgG3) cu supernatante de cultură şi cu celule. După cum s-a detectat prin metoda RIA indirectă în fază solidă, toate melanocitele, nevi, melanoamele primare în faza de creştere verticală şi radiară, precum şi melanoamele metastatice, îndepărtează antigenul definit de ME311 în timp ce celule din carcinom de colon şi rectum, pancreas, ovar, vezica biliară, cervix, sân, plămân, neuroblastoma, glioma şi fibroblaşti nu au dat această reacţie.

S-a observat o exprimare aberantă a gangliozidelor pe suprafaţa celulară a diferite neoplasme umane. S-a arătat că multe dintre aceste gangliozide induc răspunsul imun (anticorpi) la om. S-a demonstrat că răspunsul imun umoral la gangliozidele specifice de pe celulele tumorale joacă un rol important în imunitatea protectoare a gazdei şi se corelează cu supravieţuirea prelungită. Există un număr de AcM de şoarece faţă de determinanţii carbohidrat de pe moleculele glicolipidice care sunt asociate cu cancerul uman. Aceşti anticorpi au furnizat un instrument important pentru identificarea determinantilor şi secvenţelor carbohidrat imunogenic specifici, şi mulţi dintre aceşti AcM de şoarece au fost folosiţi în teste clinice în tratamentul cancerului, iar în câteva cazuri s-a produs un beneficiu semnificativ. Rezultatul este tranzitoriu deoarece formarea anticorpilor umani la anticorpii de şoarece exclude perioade de tratament repetate şi prelungite. În plus, sistemul imun de şoarece poate recunoaşte diferiţi determinanţi antigenici din sistemul imun uman şi adesea evidenţiază determinanţii (determinantul) antigenici polimorfi pe suprafaţa celulelor canceroase umane, producând în loc de aceasta anticorpi care reacţionează deasemenea cu celulele umane normale.

Un efort considerabil a fost realizat pentru a dezvolta anticorpi monoclonali umani în scopuri terapeutice şi ca instrument pentru a identifica deteminanţii imunogeni pe celulele tumorale umane. Producerea cu succes a AcM umani la antigenii asociaţi tumorilor a depăşit ca performanţă anticorpii monoclonali de şoarece. Problema principala este dezvoltarea liniilor stabile pe termen lung care secretă anticorpi în mod continuu. S-a reuşit stabilirea mai multor AcM la antigenii gangliozidici asociaţi tumorilor, prin transformarea celulelor B ale pacienţilor cu VEB. Această modalitate a fost utilizată cu succes pentru a stabili AcM la antigenii gangliozidici GM2 şi GD2 asociaţi tumorilor. S-a demonstrat că injecţiile intraleziune cu aceşti AcM pot induce regresia tumorilor melanoma. AcM cu specificitate pentru determinanţii

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

antigenici gangliozidici dominanți asociați tumorilor pot avea potențial terapeutic mai bun decât AcM umani cu specificitate pentru determinanții antigenici mai puțin dominanți (D. S. B. Hoon și colab., 1993).

Unul dintre antigenii care a fost identificat prin metode biochimice ca dominant pe suprafața celulară a mai multor tumori umane, îndeosebi melanoma, este GM3. Acest gan-gliozid se găsește pe celulele normale umane dar având o densitate mult mai joasă decât în cazul celulelor de melanoma umană. S-a relatat că AcM de șoarece M2590 reacționează cu antigenul GM3 pe melanoma B16 dar nu pe celulele normale, deoarece GM3 posedă o densitate mult mai mare și o structura terțiară pe suprafața celulelor melanoma. A fost produs deasemenea AcM murin 202 care recunoaște dizaharidul terminal (sialil α2-3Gal) al GM3 și/sau GM2; AcM 202 reacționează cu GM3 al melanomului uman dar nu al țesutului normal. Specificitatea acestui anticorp monoclonal pentru celulele melanoma poate fi deasemenea datorată densității antigenului. Anticorpul monoclonal uman care își recunoaște epitopii carbohidrat poate avea o utilizare restrânsă a regiunilor V_H și V_L. Stabilirea și clonarea anticorpilor monoclonali umani specifici epitopilor carbohidrat va da răspunsul la această întrebare.

Pentru dezvoltarea anticorpilor monoclonali cu valoare terapeutică față de GM3 este necesară caracterizarea specificității de legare și secvența variabilă a AcM L612 care se leagă puternic la GM3 și reacționează cu țesuturile tumorale umane dar nu cu cele normale. AcM L612 a fost stabilizat prin transformarea cu VEB ale celulelor B de la pacienți. Celulele B erau din noduli limfatici regionali a unei paciente cu cancer de sân care suferise limfoadectomie electivă. Limfocitele au fost obținute prin trecerea nodulilor limfatici disecați printr-o plasă de oțel și separarea prin gradient de Ficoll-Hypaque. Celulele T au fost îndepărtate prin E-resetare. Fracția îmbogățită în celule B a fost spălată cu tampon și incubată cu VEB în mediul de cultură conținând ser inactivat de vițel fetal. Celulele B au fost apoi clonate prin diluție limitată și testate pentru secreția anticorpilor prin testul de imunoaderență.

În investigarea pentru clonele de celule B care produc anticorpi anti-GM3 au fost alese ca și celule țintă linia celulară melanoma M12. Au fost utilizate celulele respective pentru că s-a găsit că M12 exprimă o densitate înaltă de GM3 pe suprafața celulară. Clonele de celule B care secretau anticorpi și reacționau cu M12 la testul de imunoaderență au fost reclonate pentru a produce o mare cantitate de celule B (L612) care produc anticorpi cu reactivitate înaltă la M12. Anticorpul monoclonal uman L612 a fost purificat pentru analiză și terapie după cum s-a descris anterior. Pe scurt, linia celulară L612 a fost crescută pe mediu fără ser. IgM din mediul concentrat a fost purificat prin precipitare salină și hipotonică urmată de cromatografie pe coloană de Sephacryl S-300. Fiecare fracție a fost testată pentru concentrația proteică prin analiza spectrofotometrică și titrul anti-GM3 prin testul imunosorbentului legat de enzimă. Au fost reținute fracțiile conținând o concentrație egală de proteină și IgM umană cu înaltă activitate anti-melanoma. Un test de imunoaderență a fost realizat pe linii celulare de cultură. Imunoaderența este o metodă foarte sensibilă pentru a detecta anticorpii care leagă complementul la celulele tumorale. Testul detectează IgM legată la celule tumorale prin formarea rozetei specifice a eritrocitelor umane în prezența complementului. Aderența eritrocitelor umane preinvestigate la suprafața celulei a fost gradată: 4+, 3+, 2+, 0. Absorbția imună a fost realizată în multe experimente înainte de testul de imunodozare. Testul de imunoabsorbție a implicat incubarea anticorpilor monoclonali umani cu antigen purificat, cum ar fi gangliozide sau celule, înainte de a realiza testul de imunodozare. Acest test permite analiza specificității anticorpului prin blocarea competitivă a antigenului. Atât liniile melanoma cât și liniile de limfoblaști B transformați cu VEB au provenit de la pacienți. Secțiuni de țesut au fost tăiate din biopsii umane în stare înghețată. Secțiunile au fost fixate imediat în tampon formaldehidă și uscate la aer. Preparatele au fost tratate cu apă oxigenată pentru a distruge activitatea peroxidazică endogenă. Preparatele au fost apoi tratate cu ser uman. A urmat o tehnică de colorare cu imunoperoxidază în trei etape

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

pentru a detecta AcMU L612 care se leagă la secţiunile de ţesut. Pentru aceasta, secţiunile de ţesut au fost mai întâi incubate cu AcMU L612 şi ulterior cu un AcM de şoarece α-anti-idiotip faţă de L612. Anticorpii indicatori au constat din IgG biotinilată de capră anti-şoarece şi streptavidină conjugată cu peroxidază. Plăcile cu gangliozide au fost incubate cu L612 iar apoi cu IgM conjugată cu peroxidază, de capră anti-om şi s-a adăugat peroxid de hidrogen şi o-fenilendiamină. În vederea clonării a fost preparat un ARN din linia L612 de limfoblaşti B. ARN a fost amestecat fie cu 3' primerii catenei grele μ, fie cu ai catenei uşoare k şi încălzite la 70 °C; amestecul a fost adăugat la soluţie de revers transcriptază şi deoxi-ribonucleozidtrifosfaţi (dNTP). Produsul PCR a fost analizat pe gel de agaroză 2%. Primerii catenei grele μ şi ai catenei uşoare k au produs 495 şi, respectiv, 603 perechi de baze ADNc. Produşii gelului au fost izolaţi şi supuşi extracţiei cu fenol-chloroform şi precipitării cu etanol. ADN a fost apoi clivat cu enzime de restricţie adecvate, extras, precipitat, purificat cu GeneClean şi ligat în Bluescript. Au fost izolate şi secvenţializate zece clone ale regiunii variabile a catenei μ şi patru clone independente ale regiunii variabile a catenei k. O probă din catena grea J_H a fost utilizată pentru investigarea şi verificarea clonelor de catenă grea. Secvenţializarea a fost făcută prin metoda dideoxonucleotidului cu DNA polimerază T7. Au fost utilizaţi trei primeri leader de catenă μ grea.

S-a găsit, prin studii de CSS, că cel puţin trei componenţi glicozidici au concentraţii crescute în ţesutul de carcinom hepatocelular (CHC). Unul din gangliozide era GM2 dar celelalte două nu au putut fi identificate datorită lipsei standardelor adecvate. Cele două gangliozide au concentraţia relativ crescută în anumite tipuri de ciroză a ficatului, îndeosebi în ciroza asociată cu CHC multicentric. S-a sugerat că aceşti componenţi ar putea servi ca markeri pentru hepatocite potenţial maligne (M. Tanno şi colab., 1993). Alterări ale compoziţiei chimice ale glicoproteinelor şi GSL precum şi schimbări ale proporţiei GSL pe suprafaţa membranei, au fost găsite în cazul celulelor animale transformate experimental cu carcinogeni chimici sau viruşi precum şi la celulele cu cancer uman spontan. A fost relatată deasemenea prezenţa antigenilor glicolipidici asociaţi tumorilor, definiţi prin intermediul anticorpilor monoclonali, la o varietate de tipuri de tumori la om. S-a urmărit localizarea imunohistochimică a gangliozidelor şi sialosilparaglobozidului de tipul α2-6galactozil, în secţiuni tisulare de ficat obţinute de la CHC de ficat, ciroza ficatului şi tumori maligne ale tractusului biliar şi gastrointestinal. S-a găsit că un anticorp monoclonal faţă de sialosil-paraglobozid izolat din CHC de ficat se leagă la celulele carcinomului hepatocitului dar nu la hepatocitele ţesutului hepatic normal sau la secţiuni de rinichi sau splină. Intensitatea colorării celulelor pozitive într-o regiune dată a secţiunii tisulare a variat mult de la caz la caz. Aceste rezultate sprijină rezultatele studiilor anterioare care sugerează o diversitate de modele gangliozidice în CHC pe baza CSS bidimensionale. CHC este puternic eterogen cu privire la metabolismul gangliozidelor, iar antigenii din celulele canceroase par a fi distribuiţi difuz. În general se crede că glicozilarea GSL are loc în complexul Golgi şi că GSL sunt deasemenea constituenţi ai membranei plasmatice. Toate secţiunile tisulare utilizate în studiul prezent proveneau de la autopsii şi aveau grosimea de 3 μ. Prin urmare este greu de admis că antigenii sunt concentraţi îndeosebi pe citoplasmă. Studii suplimentare pe ţesutul proaspăt în secţiuni subţiri prin tehnica microscopiei imunoelectronice sunt necesare pentru a determina localizarea intracelulară precisă a acestor antigeni. În anumite cazuri la nodulii cirotici au fost observate mai multe zone de celule pozitive. Aceste rezultate sugerează că aceşti componenţi sunt sintetizaţi în anumiţi noduli cirotici.

Secţiunile de ţesut de carcinom cholangiocellular se colorează deasemenea slab sau moderat cu anticorpi monoclonali. Gangliozidele totale au fost izolate din ţesutul de carcinom cholangiocellular, iar modelul CSS era foarte asemănător cu al CHC. Secţiunile de ţesut de carcinom de ficat metastatic de la cancer de colon sau cancer de stomac se colorează deasemenea slab cu anticorpi monoclonali. Prin urmare o creştere a concentraţiei acestor componente în ţesut

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

poate fi asociată cu oncogeneza sistemului hepatobiliar. Studii complementare au dus la ipoteza că acele componente erau sialosiparaglobozid.

Melanoma este rezultatul transformării neoplastice a celulelor producătoare de melanină numite melanocite, care se găsesc în piele, meninge, mucoasa ectodermală şi viscere. Gangliozidele sunt componente importante ale bistratului lipidic extern al membranelor celulelor canceroase. Gangliozidele majore din melanoma umană sunt: GM3, GM2, GD3, GD2, O-Ac-GD3. Gangliozidul major din melanocite normale este GM3. Melanocitele diploide obţinute din piele de nou-născut şi crescute prin două pasaje in vitro conţin 86-90% GM3, 2-6%GD3, 1%GM2, 2% GD1a şi 1% GQ1b.

Celulele melanoma în faza de creştere radială au un profil al gangliozidelor GM3 şi GD3 similar cu melanocitele normale. Faza de creştere verticală este marcată de o schimbare către GD3, după cum au arătat cromatogramele gangliozidelor purificate din culturi de celule melanoma provenind din biopsii şi aflate în această fază de creştere (Herlyn et al., 1985). De fapt GD3 este gangliozidul major din melanoma cutanată metastatică; se poate considera că GD2 şi O-AcGD3 sunt derivaţi ai acestuia.

6.9. Acţiuni biologice variate ale GSL

S-a arătat că Sph şi sfingozin fosfatul (SphP), metaboliţi ai sfingolipidelor membranei, stimulează eliberarea Ca^{2+} din surse interne şi creşte proliferarea fibroblaştilor 3T3 în repaus acţionând pe o cale fundamental diferită, separată de PKC. Efectul mitogen al Sph era însoţit de o creştere a nivelului acidului fosfatidic (AP), care prezintă activitate mitogenă pentru o diversitate de celule, astfel că ar putea funcţiona ca mesager secund intracelular. Sph induce deasemenea creşterea promptă a SphP care precedă creşterea acidului fosfatidic. SphP produce o creştere mai rapidă a AP sugerând că mediază efectele Sph în acumularea de AP. Dependenţa de concentraţie pentru formarea AP indusă de SphP se corelează cu efectul său asupra sintezei ADN. Similar cu Sph, SphP stimulează fosfolipaza D, un efect semnificativ fiind observat la concentraţii mult mai mici.

Sph joacă un rol important ca reglator pozitiv al creşterii celulare. La concentraţii joase, Sph stimulează sinteza ADN şi o creşte şi a numărului celulelor din cultura de fibroblaşti în repaus Swiss 3T3. Sph potenţează deasemenea acţiunea mitogenă a multor factori de creştere cunoscuţi, inclusiv EGF, factorul de creştere derivat din plachete, bombesina şi insulina. Numai izomerul natural al Sph (D-eritro-Sph) posedă aceste activităţi biologice. Recent, s-a găsit că concentraţii mitogene de Sph induc rapid o creştere susţinută a nivelului SphP. SphP este cunoscut a fi produs din Sph prin acţiunea unei kinaze specifice şi este degradată rapid, prin acţiunea unei liaze microzomale, la trans-2-hexadecenal şi fosforil-etanolamină. Similar cu efectele mitogene ale Sph, concentraţii joase de SphP stimulează sinteza ADN şi induc modificări morfologice pronunţate. Deşi Sph şi SphP acţionează sinergic cu o mare varietate de factori de creştere, nu s-a observat nici un efect sinergic sau aditiv ca răspuns la acţiunea simultană a Sph şi SphP. Aceste rezultate sugerează că Sph şi SphP controlează răspunsuri celulare în fibroblaştii Swiss 3T3 printr-un mecanism comun şi că cel puţin în parte mitogenicitatea indusă de Sph poate fi datorată unei creşteri rapide a nivelului SphP.

Tentativa de a identifica căile biochimice implicate în proliferarea celulară indusă de Sph şi SphP a dus la investigarea efectelor Sph şi SphP exogene asupra multor molecule-semnal intracelulare care se presupune că joacă un rol în proliferare, incluzând protein kinaza C (PKC), calciul, acidul fosfatidic (AP), inozitol trifosfatul (IP_3) şi cAMP.

Bell şi colab., au atribuit pentru prima oară un rol potenţial sfingozinei ca modulator negativ al PKC. Din lucrările lui S. Spiegel şi colab., pare evident că efectul Sph asupra

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

proliferării celulare în fibroblaştii Swiss 3T3 este independent de PKC. În primul rând sinergismul dintre concentraţiile optime de Sph şi SphP, phorbol ester şi TPA, sugerează că aceşti compuşi nu acţionează printr-o cale mitogenă comună. În al doilea rând, în timp ce Sph nu are nici un efect, H7 inhibă fosforilarea indusă de către TPA a unei proteine celulare acide de 80kDa, un substrat specific pentru PKC în fibroblaştii Swiss 3T3. În al treilea rând, stearilamina sau N-stearilsfingozina, analogi ai Sph care inhibă PKC similar cu aceasta, nu mimează efectele mitogene ale Sph. Aceşti compuşi au inhibat, ~~printr-un~~ efect similar lui H7, mitogeneza indusă cu TPA. În al patrulea rând, concentraţiile ~~mitogene~~ de Sph nu inhibă legarea phorbol dibutiratului la PKC în celule intacte. Finalmente, atât Sph cât şi SphP stimulează sinteza ADN în celule deficitare în PKC datorită tratamentului prelungit cu TPA iar Sph totuşi determină creşteri similare în nivelul SphP în aceste celule. Aceste rezultate susţin afirmaţia că Sph nu poate fi un modulator fiziologic al PKC din fibroblaştii Swiss 3T3 şi sugerează existenţa altor ţinte celulare pentru acţiunea Sph.

O explicaţie posibilă pentru efectul diferit al Sph asupra PKC în diferite tipuri de celule este că diferite izoenzime ale PKC pot avea sensibilitate diferită la inhibiţia cu Sph. Opt izoenzime distincte ale PKC au fost identificate până acum iar acestea au fost împărţite în două subgrupe, bazat pe prezenţa (α, ßI, ßII şi γ) sau absenţa (δ, ε, ξ şi Δ) a regiunii C2 în domeniul reglator. Numai izozima PKC-α a fost detectată în fibroblaştii Swiss 3T3 iar această izozimă ar putea fi mai puţin sensibilă la inhibiţie de către Sph, relativ la alte izozime PKC.

A fost prezentată dovada experimentală că Sph exogenă şi SphP stimulează puternic eliberarea calciului intracelular în fibroblaştii viabili de Swiss 3T3. Efectul Sph asupra $[Ca^{2+}]$ este dependent de temperatură: la temperatura camerei nu s-a observat nici un efect dar la 37°C Sph induce o creştere de patru ori a $[Ca^{2+}]_i$ în mai puţin de 1 min. Dimpotrivă, răspunsul la SphP nu se modifică prin scăderea temperaturii de la 37°C la temperatura camerei. Răspunsul la cei doi compuşi nu se modifică în absenţa calciului liber extracelular, sugerând că ei mobilizează calciul din depozitele intracelulare. Concentraţiile eficace de Sph sau SphP care cresc $[Ca^{2+}]_i$ se corelează cu dependenţa de concentraţie a mitogenezei în celulele 3T3, sugerând un rol pentru variaţia calciului intracelular în fenomenele mitogenice. Deasemenea SphP este mai activ decât Sph la stimularea eliberării calciului intracelular şi creşterea sintezei ADN, sugerând că numai o mică fracţie din Sph exogenă este convertită intracelular la SphP. De aici ipoteza că SphP mediază efectele Sph asupra $[Ca^{2+}]_i$ şi asupra proliferării celulare.

AP a fost implicat în reglarea proliferării celulare ca moleculă semnal intracelulară. AP exogen este un mitogen puternic pentru o mare varietate de tipuri celulare, inclusiv fibroblaştii Swiss 3T3 şi s-a arătat că induce modificări similare efectelor altor factori de creştere în căile de semnalizare . În plus, AP este produs în celule ca răspuns la mai mulţi factori de creştere. La fibroblaştii Swiss 3T3 în repaus, concentraţiile mitogene de Sph induc o creştere semnificativă a nivelului AP. Există o similitudine izbitoare între proprietăţile mitogene ale AP şi cele ale Sph. Sph nu numai că stimulează încorporarea [^{3}H]-timidinei cu aceeaşi cinetică şi cu eficienţă similară cu cele ale AP, ci induce deasemenea modificări morfologice similare şi nu are nici un efect suplimentar asupra sintezei ADN în prezenţa unei doze optime. În plus, AP, similar Sph, stimulează sinteza de ADN în celulele PKC-deficiente, iar Sph stimulează încă creşterea AP în aceste celule. Prin urmare, atât Sph cât şi AP stimulează proliferarea celulară printr-un mecanism independent de PKC.

S-a găsit că concentraţiile joase de SphP induc deasemenea o creştere a nivelului AP la fibroblaştii Swiss 3T3. SphP, în acord cu efectele sale asupra nivelului calciului intracelular şi mitogenezei, este mai activ decât Sph la creşterea nivelului de AP. Pentru SphP s-a găsit o corelaţie precisă între răspunsul dependent de doză în privinţa acumulării de AP şi mitogenezei. Studii cinetice au arătat că producerea de SphP precedă creşterea nivelului de AP şi că

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

descreşterea ulterioară a SphP la nivelul de bază era urmată de o scădere similară a nivelului AP. Aceste rezultate dovedesc că SphP poate media efectele Sph asupra creşterii nivelului AP.

Reglarea metabolismului AP de către Sph a constituit obiectul multor studii. S-a arătat că Sph stimulează fosfolipaza D în mai multe tipuri de celule. S-a observat că Sph scade nivelul fosfatidil-colinei în celulele hibrid NG108-15 neuroblastoma-glioma şi în fibroblaştii Swiss 3T3 şi stimulează deasemenea hidroliza fosfatidiletanolaminei la fibroblaştii NIH 3T3. În plus, Sph inhibă activitatea fosfohidrolazei AP în lizate celulare. Alte studii au arătat că Sph activează izoenzima de 80 kDa a DAG kinazei şi inhibă forma de 150 kDa. Prin urmare, efectul Sph asupra DAG kinazei, şi deci asupra producerii AP, depinde de tipul de izoenzimă a DAG kinazei prezentă într-un anumit tip de celulă.

S-a observat că SphP stimulează activitatea fosfolipazei D în fibroblaştii Swiss 3T3, dependenţa răspunsului de concentraţie fiind similară stimulării acumulării AP şi diviziunii celulare. Dimpotrivă, nu a putut fi detectat vreun efect al SphP asupra activităţii fosfohidrolazei AP în celulele Swiss 3T3. Prin urmare, activarea fosfolipazei D este mecanismul cel mai probabil pentru creşterea nivelului AP indusă de către SphP.

Mecanismul molecular prin care bazele sfingoide modifică activitatea fosfolipazei D, fosfohidrolazei AP sau DAG kinazei este încă necunoscut. Cu toate acestea, trebuie notat că într-o mare varietate de celule, cu diferite căi de formare a AP, bazele sfingoide cu catenă lungă stimulează creşterea AP. Ciclurile metabolice care reglează nivelul AP şi al altor fosfolipide interacţionează cu metabolismul sfingolipidelor, mai ales prin DAG.

Activarea fosfolipazei C, care produce IP_3 şi DAG, este un eveniment cheie în modul de acţiune al multor factori de creştere. S-a arătat că AP exogen induce producerea de IP_3 în fibroblaştii 3T3. S-a arătat deasemenea că Sph şi SphP stimulează acumularea de IP_3 în fibroblaştii Swiss 3T3. Cu toate că rolul creşterii induse de Sph a IP_3 rămâne neclar, această creştere ar putea fi o consecinţă secundară la acumularea de AP.

6.10. Unele funcţii fiziologice ale glicosfingolipidelor

Metabolismul GSL, în speţă al gangliozidelor a fost corelat cu scleroza laterală amiotrofică. Această maladie este caracterizată printr-o pierdere progresivă a neuronilor motori superiori şi inferiori. Etiologia acestei maladii este necunoscută. S-a studiat fluidul cerebrospinal de la pacienţi cu această maladie. Primele investigaţii au avut ca rezultat detecţia în ser a unor anticorpi policlonali anti-GM1. În urma acestor cercetări s-a decis studierea fluidului cerebrospinal; aceasta deoarece schimbările patologice au loc în cea mai mare parte în SNC şi deoarece nu există o perturbare semnificativă a barierei dintre creier şi fluidul sanguin.

Pentru aceasta au fost studiate: numărul celulelor din fluidul cerebrospinal, albumina, IgG, IgM, precum şi relaţia dintre aceste imunoglobuline şi gangliozide. Corelaţia a vizat următoarele gangliozide: GM1, GM2, GM3, asialoGM1, GD1a, GD1b, GT1b. Anticorpii din ser faţă de gangliozidele menţionate au prezentat un model caracteristic care a permis o diferenţiere între pacienţii cu scleroza laterală amiotrofică şi pacienţii de control precum şi o diferenţiere între pacienţii cu scleroza laterală amiotrofă şi pacienţii cu alte maladii neurologice; mai precis pacienţii cu scleroză laterală amiotrofă au o concentraţie crescută de IgM în lichidul cerebrospinal iar acest anticorp este ligand pentru toate gangliozidele de mai sus cu excepţia lui asialo-GM1. Corelaţia dintre studiul lichidului cerebrospinal şi ser a fost mai puţin evidentă (A. Stevens şi colab., 1993).

O altă maladie în care sunt implicate gangliozidele este osteoartrita. Această maladie constă într-o degenerare progresivă a încheieturilor şi în pierderea treptată a cartilagiilor din articulaţii. Unele studii au relevat o disfuncţie a glicozil transferazelor care sintetizează glicoconjugate. Ulterior au fost dozate gangliozidele din aceste cartilagii comparativ cu cartilagiile

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

de la indivizi sănătoşi. S-a găsit o scădere cu 40% (raportările s-au făcut la unitatea de greutate (mg) de ADN) a gangliozidelor. S-a mai observat la pacienţii cu osteoartrită o eterogenitate a gangliozidelor GD3 şi GM3. Pentru GM3 au fost observate trei benzi iar banda inferioară a avut o evoluţie cantitativă contrară în sensul că la pacienţii cu această maladie, concentraţia GM3 din această bandă era de 5 ori mai mare. Interpretarea autorilor este următoarea: această bandă conţine GM3 cu ikosasfingozină; (o interpretare mai plauzibilă a rezultatului de mai sus este că banda cu concentraţia mai ridicată conţine o fracţie ceramidică mai polară (AG 2D-hidroxi şi fitosfingozină sau sfingozină cu catenă mai scurtă)) (M. J. David şi colab., 1993).

GSL sunt implicate în constituţia aparatului ocular şi chiar în procesul vederii. Într-un studiu s-a cercetat compoziţia comparativă în GSL a cristalinului întreg, a epiteliului şi a capsulei cristalinului precum şi a unor culturi monostrat de celule epiteliale provenite din cristalin. Speciile pe care s-a lucrat au fost în special maimuţă şi câine, dar şi alte vertebrate. S-au obţinut următoarele rezultate: ţesutul cristalinului de la vertebrate conţine atât GSL acide cât şi GSL neutre. În cazul celor două specii s-a găsit că epiteliul posedă o compoziţie mai simplă şi un conţinut mai scăzut de GSL decât cristalinul întreg. S-a mai observat că gangliozidele şi GSL neutre din culturi monostrat a celulelor epiteliale sunt deasemenea diferite în epiteliu faţă de cristalinul întreg. Astfel, în timp ce epitopi ca Galα1-3-R sau Galß1-4(Fucα1-3)GlcNAc-R (Lewis x) au fost găsiţi în GSL a cristalinului întreg, ei nu au putut fi detectaţi în culturi de celule monostrat provenite din epiteliul cristalinului fie de la maimuţă fie de la câine. S-au observat schimbări semnificative în seriile ganglio de gangliozide în care gangliozidele GM3 şi GD3 erau predominante. Studii de imunofluorescenţă au relevat o distribuţie caracteristică a gangliozidelor pe suprafaţa celulară în monostraturi confluente. Aceste rezultate sugerează că sinteza GSL în epiteliul cristalinului este intrinsec diferită de sinteza din fibrele corticale şi nucleare. Totodată, exprimarea epitopilor Galα şi Lewis x în cadrul GSL pare a fi asociată cu diferenţierea celulelor epiteliale la fibre (M. Ogiso şi colab., 1994).

Profilul în gangliozide a fluidului cerebrospinal a fost studiat pe subiecţi sănătoşi în perioada de după naştere până la adolescenţă. Au fost vizate următoarele gangliozide, toate aparţinând seriei gangliotetraoză: GM1, GD1a, GT1a, GD1b, GT1b, GQ1b. S-a găsit că nivelul gangliozidelor totale din seria ganglio creşte de 3,8 ori în perioada de după naştere până la vârsta de 5 ani; această creştere este urmată de un platou şi apoi de o scădere uşoară. Profilul de evoluţie al gangliozidelor individuale diferă de la un gangliozid la altul. De ex. pentru gangliozidul GM1 maximul este atins la 4 ani în timp ce la gangliozidul GD1a acest maxim este atins în jurul vârstei de 2 ani. Evoluţia gangliozidelor pe serii a arătat că gangliozidele din seria b (GD1b, GT1b, GQ1b) au o creştere rapidă până la vârsta de 4 ani şi jumătate, urmează o scădere de asemenea bruscă şi apoi un platou. Gangliozidele din lichidul cerebrospinal variază cu vârsta ceea ce reflectă schimbările de maturizare ale SNC în materie de gangliozide. Astfel de structuri sunt utile pentru aprecierea evoluţiei SNC în timp precum şi pentru decelarea unor maladii ale SNC (T. Izumi şi colab., 1993).

Gangliozidul GM1 este un constituent binecunoscut al membranelor plasmatice ale celulei neurale. Subunitatea B a toxinei holerei prezintă o afinitate pronunţată pentru gan-gliozidul GM1, motiv pentru care se leagă selectiv la acesta. Bazat pe această proprietate, s-a studiat evoluţia membranei plasmatice a celulei în materia cenuşie în raport cu expresia gangliozidului GM1 în cordul spinal uman în perioada postconcepţie (săptămânile de viaţă intrauterină 6-11). A fost evidenţiată prezenţa gangliozidului GM1 în următoarele formaţiuni: în celulele materiei cenuşii în dezvoltare, în stratul marginal (substanţa albă), pe membranele plasmatice derivate din creasta neurală (de ex. rădăcina dorsală şi ganglionii simpatici), de-a lungul fibrelor emergente de la rădăcina dorsală a ganglionului şi în neuritele terminale care inervează musculatura scheletică. Gangliozidul GM1 este intens exprimat în celulele cordului spinal şi constituie un marker

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

consacrat al celulelor neurale. El reprezintă deasemenea un marker al diferenţierii neurale, atât în celulele provenite din cordul spinal cât şi în cele din creasta neurală (V. Silani şi colab., 1993).

Numeroase studii în privinţa exprimării gangliozidelor în diferite celule şi ţesuturi au fost realizate cu ajutorul AcM. A fost elaborat AcM AMR10 faţă de gangliozidul GM4 şi s-a studiat specificitatea acestuia pentru diferiţi izomeri ai gangliozidului GM4 preparaţi prin sinteza chimică şi pentru alte gangliozide. Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 64.

Tabelul 64.Reactivitatea AcM AMR10 faţă de diferiţi antigeni glicolipidici.

Glicolipid	Reactivitate
GM4 (din creier uman)	+++[a]
GM4 ($\alpha\beta$)[b]	+++
GM4 ($\alpha\alpha$)	-
GM4 ($\beta\beta$)	-
GM4 ($\beta\alpha$)	-
GM3	-
GD1a	-
GM1b	-
GT1b	-
IV^{3}NeuAcαnLc4Cer	-

a Reactivitatea AcM AMR10 faţă de antigenii GSL este gradată astfel: +++, reactivitate intensă; ++, reactivitate moderată; +, reactivitate slabă; -, lipsă de reactivitate.
b GM4 indicat cu două litere greceşti în paranteză a fost obţinut prin sinteză chimică; prima literă indică anomeria legăturii dintre NANA şi Gal iar a doua indică anomeria legăturii dintre Gal şi Cer.

După cum se observă din Tabelul 64, specificitatea AcM faţă de gangliozidul GM4 este extrem de pronunţată. Acest AcM a fost utilizat pentru a evalua exprimarea gangliozidului în creier de om şi găină. S-a observat că gangliozidul GM4 este bine exprimat la nivelul astrocitelor din stratul granular şi din materia albă dar nu în mielină (H. Ozawa şi colab., 1993). Studii biochimice anterioare au indicat prezenţa gangliozidului GM4 în mielina din SNC de om şi găină; aceasta s-ar putea explica prin faptul că fracţiile de mielină purificate prin tehnici biochimice erau contaminate cu astrocite din materia albă a creierului. Pe de altă parte, GalCer şi GalCer sulfatul sunt distribuite în mielină şi oligodendrocite, după cum a rezultat de la analiza cu anticorpi policlonali şi cu anticorpi monoclonali.

Există actualmente numeroase studii care vizează asocierea unor maladii cu gangliozidele precum şi implicaţii terapeutice posibile ale GSL. Astfel de studii s-au realizat în cazul encefalopatiei spongiforme subacute. Aceasta este o maladie rară dar fatală a SNC de la animale şi om. Ea este cauzată de agenţi transmisibili din care a fost izolată o singură componentă: o proteină de membrană (PrP). Această proteină de membrană suferă o modificare posttranslaţională necaracterizată încă. Studiul gangliozidelor din creier de hamster infectat cu această maladie, în comparaţie cu creierul normal a arătat următoarele: la animalele infectate, gangliozidul GD1a era semnificativ mai scăzut; s-a observat totodată o creştere cantitativă şi o diversificare apreciabilă a gangliozidelor alcali-labile, la animalele infectate (A. DiMartino si colab., 1993).

Există actualmente o experienţă relativ bogată asupra utilizării GSL în terapeutică; administrarea unor GSL duce la recuperarea mai rapidă a ţesuturilor şi celulelor care au suferit

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

diferite leziuni. Un astfel de ex. îl constituie accidentele cerebrale; în bună măsură conceptul de neuroplasticitate este datorat GSL: refacerea membranei cu ajutorul GSL exogene. Au apărut însă şi cazuri când administrarea GSL a avut şi reacţii secundare. Spre exemplificare, un pacient căruia i s-au administrat intramuscular gangliozide din creier bovin a manifestat o afecţiune a neuronului motor care seamănă cu scleroza laterală amiotrofică (N. Yuki şi colab., 1991). În serul pacientului respectiv s-a găsit un titru foarte înalt al imunoglobulinei IgM anti-GM2 iar pacientul respectiv s-a recuperat foarte rapid în urma plasmaferezei. S-a constatat că IgM anti-GM2 era responsabilă pentru mimarea sclerozei laterale amiotrofice. Un preparat din IgM respectivă a mai prezentat afinitate pentru următoarele GSL: GalNAc-GM1b, GalNAc-SPGα2-3 şi GalNAc-GD1a, dar nu pentru GA2 şi GD2. Prin urmare epitopul recunocut de IgM posedă o structură terminală de tip GM2: GalNAcß1-4(NeuAcα2-3)Galß1-. Cercetând cauza apariţiei la pacientul respectiv a IgM anti-GM2 s-au descoperit în creierul bovin două gangliozide noi care aparţin seriei lacto cu următoarea structură: GalNAcß1-4(NeuAcα2-3)Galß1-3GlcNAcß1-3(GalNAcß1-4)Galß1-4Glcß1-1'Cer şi, respectiv, GalNAcß1-4(NeuAcα2-3)Galß1-3GlcNAcß1-3(Galß1-3GalNAcß1-4)Galß1-4Glcß1-1'Cer. Structurile lor neobişnuite le-a conferit proprietăţi imunogenice intense la om care au indus anticorpul anti-GM2 (T. Nakao şi colab., 1993).

Numeroase studii privind distribuţia şi funcţiile GSL au fost efectuate pe constituenţii sanguini. Granulele dense din plachetele sanguine umane depozitează şi eliberează serotonină (5-hidroxitriptamină, 5HT). Din acest motiv plachetele şi granulele dense din plachete sunt considerate de farmacologi şi neurologi drept modele accesibile, relativ simple, pentru depozitarea şi eliberarea neurotransmiţătorilor cum este cazul 5HT. Hematologii studiază granulele dense pentru a elucida rolul acestora în disfuncţiile privind depozitarea şi eliberarea 5HT. Experimentul prezentat aici se bazează pe elaborarea unui model de caracterizare biochimică a granulelor dense din plachete. Modelul respectiv permite determinarea afinităţii granulelor dense din plachete pentru [^{3}H]ketanserină. Acest compus se adsoarbe pe membrana granulelor; marcarea este inversată cu tetrabenazină. Profilul în fosfolipide şi gangliozide a indicat următoarele. Gangliozidul predominant din plachete, GM3, se găseşte în concentraţii înalte în granulele dense. De aici ipoteza că complexul transportor de 5HT este asemănător în granulele dense din plachete, în granulele cromafinice şi în veziculele sinaptice. Găsirea gangliozidului GM3 în granulele dense din plachete nu a explicat şi rolul funcţional al gangliozidului în aceste organite(D. Chatterjee şi G. M. Anderson, 1993).

Numeroase studii privind funcţiile GSL au fost realizate pe culturi de celule; mult mai puţin frecvente sunt cele pe organisme întregi; de aici discrepanţele ce apar în interpretarea rezultatelor. Funcţiile biologice ale GSL sunt cunoscute numai parţial până în acest moment. În ceea ce priveşte modalităţile de studiu ale glicolipidelor, acestea pornesc de la distribuţia universală a acestor compuşi în toate tipurile de ţesuturi şi de celule, inclusiv în oase. Multe studii privind activitatea biologică a glicolipidelor s-au realizat pe hepatocit de şobolan în cultură. Studii anterioare privind dependenţa paletei de gangliozide de vârstă şi sex, efectuate pe ficat de şobolan "in vivo", însoţită de determinarea concomitentă a activităţilor anumitor enzime implicate în căile metabolice, au relevat rolul important al sialosilării gangliozidului GM3 la gangliozidul GD3, consecinţa fiind reglarea vitezei de biosinteză a seriilor de gangliozide a şi b. Legat de aceasta s-a studiat influenţa unor hormoni asupra activităţilor enzimatice a sintazelor gangliozidelor GM3 şi GD3 pe hepatocite în cultură. S-a găsit că o multitudine de factori hormonali (insulina, glucagonul, EGF, glucocorticoizi) sunt necesari pentru a menţine "in vivo" nivelul de activitate optim al sintazelor gangliozidelor GM3 şi GD3. Implicarea generală a glicolipidelor în controlul creşterii celulare a fost indicată de către multe observaţii asupra biosintezei crescute a glicolipidelor pe măsură ce celulele în cultură ating confluenţa şi se realizează inhibiţia de contact a creşterii (M. Mesaric şi K. Decker, 1990).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

S-a găsit că proteina receptor a tirotropinei (hormonul stimulator al tiroidei, TSH) este asociată cu fracţiunea unor glicosfingolipide. Proteina respectivă aparţine familiei receptorilor care leagă proteinele cu afinitate ridicată pentru nucleotidele guaninei. Glicosfingolipidul conţine acid sialic şi aparţine familiei gangliozidelor. Studiul referitor la aceasta a fost efectuat pe linia celulară Fischer (FRTL-5) provenită din tiroidă de şobolan. Proteina în cauză a fost purificată prin cromatografie de afinitate din celulele respective, marcată biosintetic cu [^{3}H]-Gal şi [^{3}H]-GlcNAc, după care a fost separată prin SDS-PAGE. S-a obţinut o singură bandă radiomarcată la 80 kDa, corespunzătoare mărimii prezise a receptorului clonat şi care conţinea gangliozide. Gangliozidele au fost separate din proteina receptor nemarcată în etapa ulterioară SDS-PAGE şi testate prin CSS cu aglutinină din *Limax flavus* marcată cu ^{125}I sau cu subunitatea B a toxinei holerei. Testul CSS mai sus menţionat a fost realizat atât înainte de tratamentul cu sialidază din *Vibrio cholerae* cât şi după acest tratament, precum şi anterior şi ulterior tratamentului cu ß-galactozidază. Gangliozidul receptorului TSH aparţine familiei Gg4 (gangliotetraoză) având acid sialic ataşat la ambele molecule de galactoză. Acidul sialic al gangliozidului respectiv este lipsit de sarcină negativă datorită formării unor lactone interne. Compusul glicosfingolipidic este gangliozidul GD1a dublu lactonizat. Celulele din tiroidă de şobolan au fost primele tipuri din această glandă în care s-au găsit lactone ale gangliozidelor. Lactonele respective prezintă o rigiditate moleculară mult mai pronunţată decât structurile parentale, ele servesc ca zone moleculare de recunoaştere şi constituie elicitori ai imunoreactivităţii mult mai eficienţi decât compuşii din care provin. Identificarea acestui derivat gangliozidic asociat cu receptorul TSH demonstrează că el are un rol important în structura şi funcţia receptorului (W. Kielczynski şi colab., 1994).

În celulele tubulare proximale provenite din rinichi uman a fost găsit un receptor GSL pentru enterotoxina B de la microorganisme din genul *Staphylococcus*. Legarea în fază solidă a enterotoxinei B marcate cu ^{125}I la receptorul GSL este dependentă de concentraţie şi nu poate fi înlocuită cu două toxine înrudite structural ca de ex. enterotoxina A stafilococcică sau toxina 1 ce realizează sindromul de şoc toxic. Celulele ca atare provenite din rinichiul de şobolan nu se leagă la enterotoxina B stafilococcică marcată cu ^{125}I dar dacă celulele de şobolan sunt preincubate cu digalactozil ceramid rezultă o legare dependentă de concentraţie. O serie de tehnici fizico-chimice (derivatizarea cu trimetil clor silan a metil glicozidelor, cromatografia gaz-lichid, spectrometria de masă) au arătat că galactoza este componentul glucidic major al receptorului GSL. Tipurile de sfingozină prezente în acest GSL sunt: d18:2, d22:2, d23:0. Dintre acizii graşi prezenţi s-a observat palmitatul, oleatul, stearatul. Studii de permetilare ale alditol acetaţilor precum şi metoda GC-MS au relevat două glucide predominante: 2,3,4,6-tetrametil galactitol şi 2,3,6-trimetil galactitol. GSL receptorul corespunzător enterotoxinei stafilococcice este sensibil la α-galactozidază dar este rezistent la ß-galactozidază şi ß-glucozidază. Per ansamblu aceste studii au indicat că structura receptorului enterotoxinei B stafilococcice din celule tubulare proximale ale rinichiului uman este Galα1-4Galß1-1'Cer (S. Chatterjee şi colab., 1995).

În exercitarea rolului biochimic şi fiziologic gangliozidele mediază şi acţiunile altor compuşi ca de pildă integrinele. În studiul respectiv s-a utilizat ca model experimental o linie celulară de hepatocite neoplazice (CMH5123), provenite din celule hepatoma Morris 5123c cu deviaţie minimă, de şobolan. Celulele studiate aderă în substrat printr-un mecanism mediat de integrină, proteina din ser care susţine adeziunea celulară fiind vitronectina. S-a găsit că depleţia în gangliozide, obţinută prin inhibarea biosintezei gangliozidelor complexe, este însoţită de o scădere a adezivităţii celulare la substratul respectiv. Integrinele mediază efectul depleţiei gangliozidelor asupra adezivităţii celulare. Sensibilitatea la un inhibitor al integrinei, peptidul GRGDSPC, este de 10 ori mai mare decât în cazul celulelor cu depleţie de gangliozide. În plus, creşterea celulelor CMH5123 cu depleţie de gangliozide pe un mediu suplimentat în gangliozide

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

complexe a restabilit sensibilitatea celulară față de inhibitorul integrinei la același nivel cu cel din celulele martor. Depleția în gangliozide a celulelor studiate a scăzut afinitatea receptorilor vitronectinei pentru vitronectină dar fără a modifica numărul acestora . Afinitatea receptorilor vitronectinei a fost restabilită în celulele cu depleție de gangliozide prin suplimentarea mediului lor de creștere cu gangliozide complexe. Rezultă că gangliozidele participă la adezivitatea celulară ca modulatori ai receptorilor integrinei (E. Barletta și colab., 1993).

Glicolipidele joacă un rol important în procesele de imunitate fiind la rândul lor antigeni. Astfel s-a găsit că anticorpii față de glicolipide au o concentrație crescută la pacienții cu maladii ale neuronului motor, cu diferite neuropatii precum și în maladia Alzheimer. Mai multe particularități ale răspunsului imun sugerează că anticorpii sunt produși de către limfocitele B pe o cale independentă de celulele T. Aceste particularități sunt:

1. Anticorpii sunt în mod predominant din clasa IgM.
2. Anticorpii față de gangliozide sunt direcționați față de componenta carbohidrat a gangliozidelor.
3. Anticorpii antigangliozidici sunt dificil de suprimat.

Studiul respectiv a urmărit dacă gangliozidele pot induce răspunsul T-independent la șoarecii deficienți în celule T, precum și la șoarecii cu celule T normale. Pentru aceasta, animalele din cele două grupuri au fost imunizate în mod repetat cu gangliozidul GM1a conținut în lipozomi. Atât animalele lipsite de celule T cât și animalele cu celule T normale au produs, cu titru înalt, anticorpi din clasa IgM față de gangliozidul GM1. Maximul acestui titru a fost la 7 zile după fiecare imunizare și scădea la 14 zile. Titrul creștea progresiv după fiecare imunizare. Nu s-a observat apariția unei cantități semnificative de anticorp IgG anti-GM1 nici la animalele lipsite de celule T nici la cele cu celule T normale. Rezultatele de mai sus sugerează că gangliozidele elicitează răspunsul imun independent de celulele T. De aici derivă o serie de implicații ale anticorpilor anti-gangliozide în maladiile neurologice (M. L. Freimer și colab., 1993).

O serie de implicații biologice ale glicolipidelor au fost studiate cu ajutorul sistemului optic. Pentru aceasta, s-a studiat biosinteza și translocarea gangliozidelor, sialoglicoproteinelor, proteinelor și fosfolipidelor în sistemul optic de la pui de găină supuși la diferite condiții de stimuli luminoși. S-a pornit de la faptul că biosinteza gangliozidelor și sialoglicoconjugatelor are loc în aparatul Golgi, în pericarionul celulei neuronale. Din pericarion acești compuși sunt translocați, printr-un transport axonal rapid, la restul neuronului, cea mai mare parte la memebrana plasmatică sinaptică unde ei ating concentrații extrem de înalte. În cazul tractusului optic de la găina, prima etapă a biosintezei are loc în celulele ganglionare ale retinei, iar de acolo glicoconjugatele sunt translocate la terminațiile nervoase ale tectumului optic contralateral din creier deoarece nervul optic se scindează complet la aceste organisme. Pe de altă parte, studiul biosintezei gangliozidelor în tractusul optic de la găină oferă avantajul că prezintă o separare anatomică a zonei de sinteză față de zona de depozitare a produsului sintetizat . S-a pornit de la faptul că nu a putut fi detectată o biosinteză măsurabilă a gangliozidelor în zona de depozitare. Situația cu fosfolipidele este diferită deoarece există în cazul lor o reînnoire parțială în zona terminală a nervului. A fost măsurată marcarea gangliozidelor și sialoglicoproteinelor, din sistemul optic, cu ^{3}H-N-acetilmanozamină injectată intraocular, la pui expuși la lumină sau menținuți în întuneric. În retina totală nu s-a observat o diferență între cele două grupuri. Dar marcarea gangliozidelor și sialoglicoproteinelor în celulele ganglionare ale retinei provenite de la pui expuși la lumină era mult mai intensă decât la cei menținuți la întuneric (B. L. Caputto, 1989).

Se cunoaște acum că o mare parte dintre acțiunile biologice ale GSL se exercită prin intermediul N,N-dimetil-D-eritro-sfingeninei. S-a găsit că acest compus inhibă puternic PKC în timp ce D-eritro-sfingenina produce numai o inhibare slabă. S-a studiat pentru aceasta prezența N-metil transferazei responsabilă de conversia sfingozinei la N,N-dimetil sfingozină. Activitatea

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

enzimatică respectivă a fost evidențiată pe omogenat din creier de șoarece dar a fost detectată cel mult în urme în ficatul de la același organism, cu toate că țesutul hepatic este bine cunoscut pentru capacitatea de biosinteză a lecitinei de la fosfatidil etanol-amină. În cazul biosintezei N,N-dimetilsfingozinei din sfingozină, donorul de grupări metil a fost ^{14}C-A-Me (adenozil metionina). Lucrarea respectivă a constituit prima identificare a enzimei ce catalizează biosinteza N,N-dimetil-Sph. Totodată au rezultat următoarele concluzii:

1.N-Metiltransferaza responsabilă pentru sinteza N,N-dimetil-Sph este independentă de N-metiltransferaza care transformă fosfatidil-etanolamina la fosfatidil-monometil-etanolamină, fosfatidil-dietanolamină și fosfatidil-colină. Prima a fost detectată numai în creier pe când a doua este prezentă în ambele țesuturi. O schimbare a pH de la 8,8 la 7,5 a scăzut apreciabil activitatea ultimei în timp ce activitatea primei enzime s-a menținut neschimbată.

2.Prezența Sph endogene a fost sugerată prin sinteza N,N-dimetil-Sph prin incubarea ^{14}C-AMe cu omogenate de creier. Biosinteza a fost mult mărită prin adaos de Sph exogenă, sugerând că nivelul Sph libere în creier este minimală.

Efectul Sph asupra PKC și kinazei tirozinei EGF sugerează că Sph poate acționa ca un important modulator al semnalării transmembranare. Izomerii Sph obținuți prin sinteza chimică s-au comportat în felul următor asupra PKC și src-kinazei: D-eritro- și L-eritro-sfingenina au prezentat activitate slabă în timp ce L-treo-sfingenina a avut o activitate mult mai înaltă. Prin urmare activitatea inhibitorie a Sph libere nu reflectă stereospecificitatea ei naturală. N,N-dimetil-D-eritro-sfingenina (dar nu N-monometil-D-eritro-sfingenina sau N,N-dimetil-L-eritro-sfingenina) a prezentat o inhibiție puternică a activității PKC. Activitatea inhibitorie a N,N-dimetil-Sph reflectă stereospecificitatea ei naturală. Efectul N,N-dimetil-Sph asupra PKC este cantitativ diferit de acela al Sph; diferența dintre cei doi compuși este și calitativă asupra src-kinazei și tirozin kinazei EGF (Y. Igarashi și S. Hakomori, 1989).

(4E)-D-Eritro-sfingenina obținută prin sinteză chimică inhibă activitatea v-src sau c-src tirozin kinazei, măsurată pe poliglutamat-tirozină (4:1) ca substrat. Sfingozinele N-acetilate sau N-metilate nu inhibă activitatea src-kinazei ci, dimpotrivă, produc o stimulare de 1,5-2 ori a activității respective. N,N-Dimetil-D-eritro-sfingenina este un inhibitor puternic al PKC; sulfatidul, lactozilceramidul, globozidul și lactozil-sfingozina nu au prezentat un astfel de efect (Y. Igarashi și colab., 1989).

Autofosforilarea receptorului dependentă de EGF, în membrana plasmatică a celulelor A431 este stimulată în mod specific de către lizofosfolipide pe bază de fosforil-colină dar nu de alte lizofosfolipide. Gangliozidul GM3 are efect contrar: inhibă autofosforilarea receptorului dependentă de EGF în aceleași condiții în care lizofosfatidil-colina este activator (Y. Igarashi și colab., 1990).

Izomerii N,N-dimetil-Sph au acționat în felul următor asupra PKC din celule de carcinom epidermoid A431: N,N-dimetil-D-eritro-sfingenina a fost inhibitor mult mai puternic decât N,N-dimetil-L-eritro-sfingenina; D- sau L-eritrosfingenina, precum și gangliozidele au avut deasemenea un efect slab. A rezultat totodată din aceste studii că preparatele de sfingozină comercializată prezintă un efect elicitor măsurabil asupra activității kinazice a receptorului EGF. Ulterior s-au demonstrat următoarele:

1.Efectul N,N-dimetil sfingeninei asupra autofosforilării receptorului EGF în comparație cu lizosfingolipidele și alți produși catabolici.

2.Sinteza endogenă a N,N-dimetil-sfingozinei precum și absența sfingozinei nesubstituite la celulele respective.

Autofosforilarea receptorului EGF în absența detergentului a fost puternic crescută de către N,N-dimetil-D-eritrosfingenină; efectul a fost chiar mai pronunțat în absența EGF și sinergic în prezența EGF. Nu s-a observat activitate de elicitare în cazul N,N-dimetil-L-eritro-sfingeninei, D- și L-eritrosfingeninei, N-monometil-D-eritrosfingeninei, N-acetil-D-eritrosfingeninei sau a

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

unor lizoglicosfingolipide. În cazul celulelor studiate s-a observat prin marcare cu ^{3}H-Ser apariţia N,N-dimetilsfingozinei şi ceramidului în timp ce sfingozina este practic absentă. Concentraţia N,N-dimetil sfingozinei şi ceramidului a crescut când celulele au fost tratate cu un inhibitor pentru UDP-Glc:Cer ßGlc transferază (care cauzează acumularea ceramidului). Rezultă că N,N-dimetil sfingozina acţionează ca elicitor stereospecific pentru kinaza receptorului EGF şi este capabilă să producă o activitate de tip EGF in vitro chiar în absenţa EGF şi a detergentului. În condiţii fiziologice, N,N-dimetilsfingozina este catabolitul major ce rezultă prin metabolizarea ceramidului (Y. Igarashi şi colab., 1990).

Procesele de afinitate ale celulelor, mediate de către GSL, au fost studiate şi pe plachetele sanguine. Plachetele activate sunt cunoscute pentru producerea de P-selectină, un receptor de adezivitate (CD62) tip lectină. Prin intermediul acestui compus plachetele se leagă la liganzii de tip sialil Lewis X expuşi pe membranele leucocitelor. S-a urmărit dacă este posibilă interacţia directă plachetă-plachetă prin interacţia P-selectină/sialil Le X. Pentru aceasta a fost investigat extractul de gangliozide provenit din plachetele sanguine umane cu referire la prezenţa liganzilor sialil Lewis X. Pentru aceasta au fost utilizate o serie de metode sensibile: CSS de înaltă performanţă şi imunocolorarea cu anticorpul monoclonal CSLEX, sau prin tratare cu sialidază urmat de anticorpii monoclonali MC480 sau PM81. Au fost evidenţiate opt benzi sialil Lewis X. Prima dovadă că este vorba de gangliozide a rezultat din sensibilitatea acestora la sialidază sau endoglicoceramidază. Comparaţia compuşilor tip gangliozidic din plachete cu compuşi similari din cinci alte ţesuturi de provenienţă umană (granulocite, monoblaste, rinichi, endoteliu aortic, eritrocite) a arătat că există trei compuşi majori asociaţi cu plachetele. S-a demonstrat totodată că aceşti compuşi sunt caracteristici plachetelor şi nu provin din contaminarea cu granulocite. Caracterizarea gangliozidelor sLe X din plachete prin CSS de înaltă performanţă, prin CGL de înaltă performanţă şi prin reacţia cu 14 AcM specifici pentru fracţiunea oligozaharidică a evidenţiat următoarele: unul dintre compuşi este un gangliozid neolacto multifucozilat, un alt compus este un disialo neolacto fuco-gangliozid ramificat, un al treilea compus combină particularităţile structurale ale celor doi compuşi precedenţi dar este deosebit de un compus similar izolat din granulocite. Aceste structuri sunt asemănătoare gangliozidelor asociate cu fenomenul adezivităţii din alte sisteme celulare. O altă concluzie este că plachetele produc gangliozide de tip sLe X tisular specifice (liganzi sLe X). Se desprinde ipoteza că legarea plachetă-plachetă poate fi mediată prin interacţii dintre P-selectină şi sLe X în special în stadiul de activare a plachetelor.

S-a observat că există modificări ale paletei şi concentraţiei gangliozidelor în conurile de creştere ale cerebelului de şobolan în stadiul postnatal. A fost determinat conţinutul de gangliozide şi compoziţia acestora preparate din creierul anterior între ziua 0 şi ziua 6 în perioada postnatală la şobolani, în comparaţie cu membranele creierului anterior întreg provenite de la şobolani de aceeaşi vârstă. S-a găsit că cantitatea de acid sialic gangliozidic total (raportat la un miligram proteină) creşte atât în membranele creierului întreg cât şi în conurile de creştere, în zilele 0-6 postnatale. Concentraţia de gangliozide a conurilor de creştere a depăşit-o cu 35-40% pe aceea a creierului întreg în toate momentele investigate (zilele: 0, 2, 6). Gangliozidele majore din creier de şobolan au fost găsite de asemenea în fracţiile conurilor de creştere dar în cantităţi relativ diferite. Astfel modificarea binecunoscută, dependentă de cursul dezvoltării, între căile b şi a de biosinteză a gangliozidelor a fost întârziată semnificativ în conurile de creştere. De aici presupunerea că această schimbare nu este asociată cu creşterea axonului ci mai degrabă cu perioada ulterioară de sinaptogeneză. S-a observat că gangliozidul GQ1c, recunoscut de către AcM Q211, şi un gangliozid neidentificat specific conurilor de creştere sunt exprimate în conurile de creştere ale şobolanilor la ziua 0 dar descresc spre ziua şase (H. Rösner şi colab., 1993).

Receptorii moleculelor fibrinolitice, plasminogenul şi urokinaza, sunt exprimate în concentraţii înalte pe o mare varietate de celule sanguine periferice precum şi în cazul liniilor

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

celulare transformate. S-a studiat dacă gangliozidele, componente cunoscute ale foiţei externe a membranei celulare, pot modula interacţiile acestor liganzi fibrinolitici cu celulele. Concluziile sunt următoarele: plasminogenul şi urokinaza radiomarcate se leagă direct la gangliozidele insolubilizate. Interacţiile sunt de tip saturabil şi sunt inhibate cu plasminogen nemarcat sau cu urokinază nemarcată. O diversitate de gangliozide inhibă legarea ambilor liganzi la celulele monocitoide U937, iar ordinea eficienţei inhibitoare scade astfel: GD1a > GM1 > GT1b > GM2 > GM3. S-a mai arătat că componentele individuale ale gangliozidelor: hexozele, hexozaminele, AS, ceramidele şi glucocerebrozidele, precum şi fracţiunea oligoglucidică a gangliozidului GM1 sunt ineficace în inhibiţia legării plasminogenului şi urokinazei la celule sau la gangliozide insolubilizate. Legarea celor doi liganzi la celulele endoteliale şi granulocite precum şi legarea plasminogenului la plachete sunt deasemenea inhibate de către gangliozide. Celulele monocitoide U937 au fost cultivate pe gangliozide pentru a permite încorporarea acestor glicolipide în membranele celulare. După trei zile de cultură, atât legarea urokinazei cât şi legarea plasminogenului la aceste celule a fost mărită. Rezultă de aici că gangliozidele se pot lega direct la aceste componente fibrinolitice şi pot media interacţiile plasminonogenului şi urokinazei cu o varietate de tipuri celulare (L. A. Miles şi colab., 1989).

Calea alternativă a complementului la vertebrate este importantă în reacţii inflamatorii şi este activată de către anumite substanţe străine ca de ex., lipopolizaharidul bacterian, zymosanul, etc. Primul activator intrinsec cunoscut a fost receptorul tip 2 al complementului. Pornind de la similitudinea structurală a LPS şi a gangliozidelor s-a studiat interacţia dintre gangliozide şi calea alternativă a complementului. Multe dintre gangliozidele testate activează această cale într-o manieră dependentă de numărul de molecule de AS şi de glucide neutre per moleculă. Studiul dependenţei răspunsului de concentraţie sugerează o corelaţie între pragul concentraţiei în gangliozide şi concentraţia micelară critică.

Gangliozidele pot servi ca activatori ai căii alternative a complementului la animale, conducând prin aceasta la inflamaţie; se prefigurează un rol interesant, în cadrul acestei interacţii, şi pentru sialidază (H. Oshima şi colab., 1993).

Organul electric de la anumite organisme, ca de ex *Torpedo marmorata* şi *Discopyge tschudii*, prezintă marele avantaj că permite separarea elementelor presinaptice de elementele postsinaptice. A fost determinată compoziţia în gangliozide a unor organite celulare ale organului electric de la *Torpedo marmorata* şi *Discopyge tschudii*: sinaptosomi, membrane presinaptice, membrane postsinaptice, membrane veziculare sinaptice. Concentraţia totală a gangliozidelor, raportată în mod constant la un mg proteină, în membrana presinaptică este de aproximativ 2 ori mai mare decât a sinaptosomilor şi de 15 ori mai mare decât a membranelor postsinaptice. Membranele veziculelor sinaptice au cea mai înaltă concentraţie globală relativ la proteină dar o concentraţie comparabilă cu aceea a membranelor presinaptice dacă exprimarea este relativă la fosfolipide. Modelul cromatografic al acestor două fracţii este similar atât în termenii paletei totale cât şi a paletei specifice de structuri Gg4, după cum a rezultat din testul cu subunitatea B a toxinei holerei. Este remarcabilă concentraţia extrem de scăzută a structurilor monosialo şi chiar absenţa lui GM1. Pe de altă parte, membranele postsinaptice au un conţinut semnificativ mai înalt de monosialo-gangliozide, inclusiv gangliozidul GM1. Modelul sinaptosomilor este asemănător membranei presinaptice şi veziculelor sinaptice. Rezultă o deosebire evidentă în paleta de gangliozide a formaţiunilor presinaptice şi postsinaptice în cazul organului electric (R. W. Ledeen şi colab., 1993). A fost determinată compoziţia în gangliozide a membranelor îmbogăţite în receptorul nicotinic al acetilcolinei din organul electric al lui *D. tschudii* şi *T. marmorata*. Gangliozidul major în organul electric total provenit de la *Discopyge tschudii* prezintă o viteză de migrare cromatografică asemănătoare cu a gangliozidului GM2. Următoarele două gangliozide, ca pondere, sunt similare gangliozidului GD3 şi, respectiv, GD1a. Au fost observaţi deasemenea constituenţi minori care migrează asemănător cu gangliozidul

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

GM3 şi, respectiv, cu polisialogangliozidele. Membranele native purificate din organul electric a lui *D. tschudii* şi *T. marmorata* au prezentat un profil similar cu excepţia faptului că erau mai bogate într-un component tip GM1 şi aveau o proporţie mai scăzută de ganglozid tip GM2, decât organul electric total. Prin utilizarea toxinei holerei marcată cu ^{125}I pe cromatograme tratate cu neuraminidază, au fost detectate următoarele gangliozide, în membranele totale de la *D. tschudii*: GM1, GD1a. GD1b, GT1b, GQ au fost observate în urme. Tehnici de imunocitochimie au arătat colocalizarea gangliozidelor GQ1c, GT1c, GP1c, recunoscute de către AcM Q211, şi a receptorului nicotinic al acetilcolinei pe faţa ventrală, inervată, a electrocitului (V. Marcheselli şi colab., 1993).

Prezenţa asialo-gangliozidelor pe suprafaţa membranelor celulare ale celulelor din măduva osoasă şi a macrofagelor de şobolan a fost decelată prin utilizarea anticorpilor. Au fost elaboraţi anticorpi faţă de următoarele GSL: GA2, GA1, Fuc-GA1 iar anticorpii au fost utilizaţi în teste de citotoxicitate şi la colorare indirectă prin tehnica imunofluorescenţei. Testul de citotoxicitate a indicat că aproximativ 50% din macrofagele intraperitoneale de şobolan erau distruse de către fiecare anticorp antiglicolipidic de mai sus. Aceste aspecte au fost confirmate prin metoda indirectă de colorare imunofluorescentă cu anticorpi purificaţi. Granulocitele imature au fost colorate specific cu anticorp anti-GA2. Granulocitele, mielocitele şi megacariocitele erau colorate cu anticorp anti-A1. Mielocitele blastice erau colorate cu anticorp anti-Fuc-GA1 dar limfocitele nu se colorează cu nici unul dintre aceşti anticorpi anti-asialogangliozide. Concluzia este că macrofagele şi celulele din măduva osoasă posedă asialo-gangliozide în componenţa membranelor lor (T. Taki şi colab., 1981).

Ideea asocierii glicoconjugatelor prin complementaritate este rezultatul cercetărilor din mai multe laboratoare de prestigiu: laboratorul de biomembrane condus de către S. Hakomori, laboratorul de Biochimie medicală şi microbiologie condus de către K.-A. Karlsson, etc. Prima descoperire spectaculoasă în acest domeniu l-a constituit relaţia de complexare dintre toxina holerei şi gangliozidul GM1a (W. E. Van Heyningen şi colab., 1971; J. Holmgren şi colab., 1973; P. Cuatrecasas 1973). Ulterior s-a constatat că o tulpină de *Escherichia coli*, care cauzează diaree la om şi animalele de fermă, conţine o enterotoxină termolabilă înrudită pentru care gangliozidul GM1a este receptor (J. Holmgren, 1973; J. Moss şi colab., 1981. Următoarea etapă a constituit-o cunoaşterea structurii şi funcţiei acestor toxine (B. D. Spangler,1992). Astfel, ambele toxine sunt proteine heterohexamere constând dintr-o subunitate A şi cinci subunităţi B, care posedă proprietăţi enzimatice şi, respectiv, de legare. Subunităţile B, care sunt răspunzătoare pentru legarea la receptor a toxinei holerei şi a enterotoxinei termolabile, sunt omoloage în proporţie de 80% ca secvenţă a aminoacizilor; pe de altă parte secvenţa subunităţilor B a toxinei termolabile care cauzează diaree la om şi toxina corespunzătoare de la suine diferă doar prin patru aminoacizi.

Un tetraglicozilceramid care se leagă la toxina termolabilă din *E. coli* a fost izolat prin cromatografie pe coloană de Iatrobeads. Secvenţa carbohidraţilor şi compoziţia părţii lipofile au fost elucidate prin SM a compusului permetilat precum şi a unor derivaţi permetilaţi şi reduşi cu $LiAlH_4$. Ionii care ilustrează secvenţa glucidică a glicolipidului permetilat au indicat următoarea secvenţă: Hex-N-AcHex-Hex-Hex. În acest sens au fost observaţi următorii ioni: m/z 219 şi 187 (219 minus 32), m/z 464 şi 432 (464 minus 32), m/z 668 şi m/z 872, împreună cu ionul de rearanjare m/z 945 (944+1), conţinând întreaga catenă carbohidrat şi o parte din AG. Ionul cu m/z 182 a indicat că este vorba despre tipul 2 de catenă carbohidrat (Hexß-4-N-AcHex). Ionii cu m/z în domeniul 548-722 au inclus ceramidul şi au demonstrat că acesta este format din Sph şi fito-Sph, ca baze cu catenă lungă, şi din AGH şi AGN 16:0-24:0. Au mai fost decelate următoarele fragmente ionice conţinând toţi constituenţii moleculei: m/z 1183 (non-hidroxi 16:0), m/z în domeniul 1213-1325 (hidroxi 16:0-24:0). Ionii seriei cu m/z 1257-1369 au indicat prezenţa fito-

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Sph legată la AGH 16:0-24:0. În spectrele de masă înregistrate la temperaturi mai înalte au apărut ioni moleculari cu m/z 1498 (fitoSph cu AGH 16:0)-1610 (fito-Sph cu AGH 24:0).

Din intensităţile relative ale ionilor ceramidici s-a conchis că ceramidul dominant este format din fito-Sph şi AGH 22:0. Spectrul de masă al compusului permetuilat şi redus a confirmat prezenţa structurii Hex-N-AcHex-Hex-Hex-Cer, cu fito-Sph şi AGH 22:0 ca ceramid major (S. Teneberg şi colab., 1994).

Glicolipidele din celule glioma umane au fost analizate prin SM cu ioni secundari (liquid-secondary ion mass spectrometry, LSI-MS) (T. Ariga şi colab., 1996). Spectrele de masă LSI cu ioni negativi a glicolipidelor neutre au indicat ioni moleculari cu m/z $[M-H]^-$ şi ioni fragmentari având C18-Sph şi diferiţi AG cu lungimea catenei între C16:0 şi C24:0, C24:1 precum şi între C16h:0 şi C24h:0 şi C24h:1, acizii graşi α-hidroxi fiind 5-10% din AG totali. Astfel, au fost detectaţi ioni moleculari cu m/z 754 şi 810 corespunzători la Cer-Hex conţinând C20:0 şi C24:0 şi ioni moleculari cu m/z 772 şi 828 corespunzători aceluiaşi compus conţinând C20h:0 şi C24h:0. Pentru alte glicolipide neutre au fost observaţi ionii moleculari cu m/z 860 şi 972 corespunzători la Cer-Hex-Hex având AGN cu C16:0 şi C24:0 precum şi ionii moleculari cu m/z 1022 şi 1134 corespunzători la Cer-Hex-Hex-Hex având aceiaşi AG. Cinci grupuri majore de ioni au demonstrat prezenţa unui tetraglicozilceramid: Cer (m/z 536 şi 646), Cer-Hex (m/z 698 şi 808), Cer-Hex-Hex (m/z 860 şi 970), Cer-Hex-Hex-Hex (m/z 1022 şi 1132) şi Cer-Hex-Hex-Hex-HexNAc (m/z 1225 şi 1335). Ionii moleculari $[M-H]^-$ cu m/z 1225 şi 1335 corespund glicolipidului conţinând C18-Sph şi C16:0 sau C24:1 ca AG. O paletă de şapte ioni majori a indicat prezenţa unui pentahexozil-ceramid: Cer (m/z 536 şi 646), Cer-Hex (m/z 698 şi 808), Cer-Hex-Hex (m/z 860 şi 970), Cer-Hex-Hex-HexNAc (m/z 1063 şi 1173), Cer-Hex-Hex-Hex-HexNAc-Hex (m/z 1225 şi 1335), Cer-Hex-Hex-HexNAc-deHex (m/z 1209 şi 1319) şi), Cer-Hex-Hex-HexNAc(-deHex)-Hex (m/z 1371 şi 1481). Ionii moleculari $[M-H]^-$ cu m/z 1371 şi 1481 corespund unui GSL conţinând C18-Sph şi C16:0 sau C24:1 ca AG. Doi ioni moleculari cu m/z 1882 şi 1992 au dezvăluit prezenţa unui octahexozil-ceramid: Cer-Hex-Hex-HexNAc(-deHex)-Hex-HexNAc(-deHex)-Hex. Grupul de ioni cu m/z în domeniul 1371-1481 reprezintă specii moleculare ale Le^x.

Datele combinate au indicat prezenţa următoarelor GSL neutre: GlcCer; GalCer; LacCer; Gb3Cer; Gb4Cer; Galß1-4(Fucα1-3)GlcNAcß1-3Galß1-4Glcß1-1'Cer (Le^x , $III^3FucnLc_4$); difucozilneolactonorhexaozil ceramid Galß1-4(Fucα1-3)GlcNAcß1-3Galß1-4(Fucα1-3)GlcNAcß1-3Galß1-4Glcß1-1'Cer ($V^3FucIII^3FucnLc_6$).

Din celulele melanoma a fost izolat un GSL acid, denumit provizoriu antigenul ME 311, care s-a transformat în gangliozidul GD3 prin HAS. Analiza FAB-MS a ionilor negativi a indicat că structura antigenului ME 311 din melanoma este următoarea: Neu5,9-diAcα2-8Neu5Acα2-3Galß1-4Glcß1-1'Cer. Spectrometria de masă FAB a utilizat ca standard gangliozidul GD3 şi s-a observat că acest gangliozid prezintă acelaşi profil al AG din ceramid ca şi antigenul ME 311: AGN 24:1 legat la Sph d18:1. Rezultatele au fost următoarele: ionul de masă dominant pentru antigenul ME 311 a fost m/z 1616. Acesta corespunde unui ion negativ format prin pierderea din molecula completă a doi atomi de H şi captarea unui ion de sodiu: m/z=1595-2+23 sau $(M-2H^+ + Na^+)^-$. S-a format deasemenea peak-ul $(M-H^+)^-$ cu m/z= 1594. Peak-urile ionilor au indicat deasemenea fragmentul corespunzător speciilor de ceramide conţinând un AG 16:0, şi anume cu valoarea m/z 1506 (1616 –110). Antigenul ME 311 a dat deasemenea următoarele fragmente: m/z= 1261 pentru (1616 – NeuNAc + 42) şi m/z= 970 pentru (1616-2NeuNAc+ 42). Au fost detectate deasemenea fragmente formate din ceramid (m/z= 646) şi ceramid-hexoză (m/z= 808). Gangliozidul GD3 a dat o paletă de fragmentare similară, MM fiind mai scăzută. Astfel fragmentul $(M-2H^+ + Na^+)^-$ a dat m/z= 1574 (pentru ceramidul format din BCL d18:1 şi AG 24:1) şi m/z=1464 (pentru ceramidul format din BCL d18:1 şi AG 16:0). Prin urmare masa totală a antigenului ME 311 este cu 42 uam mai mare decât a gangliozidului GD3. Deoarece

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

fragmentarea celor doi compuşi *dinspre capătul ceramidic* este identică, diferenţa de masă poate fi atribuită numai porţiunii terminale a moleculei. Din analiza FAB-MS s-a dedus următoarea secvenţă: (Neu5Ac+ 42)- Neu5Ac- Hex- Hex- Cer; prin urmare structura antigenului ME 311 este cea indicată (J. Thurin şi colab., 1985).

Un nou antigen glicolipidic conţinând galactofuranoză (Galf) a fost găsit în *Paracoccidioides brasiliensis* (S. B. Levery şi colab., 1996). S-a constatat că un glicolipid acid, purificat din *P. brasiliensis* printr-o combinaţie de metode cromatografice (cromatografie de schimb ionic, HPLC, HPTLC), reacţionează cu serul tuturor pacienţilor ce suferă de paracoccidioidomicoză. Analiza monozaharidelor glicolipidului respectiv a dat Man şi Gal în raportul 2:1, iar hidroliza acidă blândă şi oxidarea menajată cu periodat combinată cu reducerea cu NaB^3H_4 au indicat prezenţa galactofuranozei în poziţie terminală. Datele de analiză preliminară prin RMN-^{1}H şi SM au sugerat că structura glicanului este Galfß1-6(Manpα1-3)Manpß1-2Ins (Ins=mioinozitol). Îndepărtarea galactofuranozei a scăzut cu 60-80% reactivitatea serului pacienţilor cu paracoccidioidomicoză faţă de glicolipidul antigen parental, ceea ce sugerează că acest fragment glucidic este imunodominant. Presupunând că galactofuranoza este absentă la mamiferele gazdă, compuşii care conţin acest rest ar putea constitui ţinte utile pentru terapia mai multor maladii datorate paraziţilor sau fungilor (S. B. Levery şi colab., 1996).

Din celule HL60 leucemice mielogenoase au fost izolate şi caracterizate gangliozidele care leagă E-selectina iar modelul de legare a fost comparat cu al neutrofilelor umane. Gangliozidele ce leagă E-selectina au fost identificate ca monosialogangliozide având o serie de miezuri polilactozamină neramificate. Structurile GSL care leagă E-selectina au fost caracterizate prin analiza grupărilor funcţionale cu ajutorul anticorpilor monoclonali, RMN-^{1}H, FAB-MS, SM prin ionizare cu electroni a compuşilor permetilaţi. Au fost găsite următoarele structuri:

NeuAcα2-3Galß1-4GlcNAcß1-3Galß1-4(Fucα1-3)GlcNAcß1-3Galß1-4(Fucα1-3)GlcNAcß1-3Galß1-4GlcNAcß1-3Galß1-4Glcß-Cer;

NeuAcα2-3Galß1-4(Fucα1-3)GlcNAcß1-3Galß1-4(Fucα1-3)GlcNAcß1-3Galß1-4(+/-Fucα1-3)GlcNAcß1-3Galß1-4GlcNAcß1-3Galß1-4Glcß-Cer (SLex cu structuri fucozilate intern);

NeuAcα2-3Galß1-4GlcNAcß1-3Galß1-4(Fucα1-3)GlcNAcß1-3Galß1-4(Fucα1-3)GlcNAcß1-3Galß1-4GlcNAcß1-3Galß1-4GlcNAcß1-3Galß1-4GlcßCer;

NeuAcα2-3Galß1-4GlcNAcß1-3Galß1-4(Fucα1-3)GlcNAcß1-3Galß1-4GlcNAcß1-3Galß1-4(Fucα1-3)GlcNAcß1-3Galß1-4GlcNAcß1-3Galß1-4Glcß-Cer.

Saposina B este o proteină lizozomală activatoare de sfingolipide care activează hidroliza gangliozidului GM1 de către ß-galactozidază. Pentru a identifica elementele structurale ale saposinei B implicate în legarea sfingolipidului, s-a studiat un peptid sintetic corespunzător unei α-spirale, sapB-18, cuprinzând resturile 52-69 ale saposinei B. Spectrul de dicroism circular al sapB-18 la pH 4,4 a indicat un conţinut de α-spirală de 44%. Studiile de fluorescenţă ale Tyr intrinsec ale sapB-18 au indicat că acest peptid leagă gangliozidul GM1 cu o K_d de 7 nM. De aici a fost emisă ipoteza că domeniul 52-69 al saposinei B constituie o α-spirală amfipatică ce joacă un rol major în recunoaşterea şi legarea gangliozidului GM1 de către saposina B (M. J. Champagne şi colab., 1994).

În tărâţe de orez au fost găsite următoarele glicoglicerolipide: $(Galα1-6)_{0-3}Galß1-3'DAG$ (Y. Fujino şi T. Miyazawa, 1979). Din seminţe de fasole Adzuki (*Vigna angularis*) au fost izolate mai multe glicoglicerolipide conţinând 1-4 unităţi de hexoză. Structurile lor au fost determinate prin: hidroliză enzimatică, analiză de permetilare, spectroscoîpie RMN, cromatografie lichidă în fază inversată la presiune înaltă. Au fost găsite următoarele structuri: Galß1-3'DAG ca monoglicozil-diacilglicerol (MGDG), Galα1-6Galß1-3'DAG (DGDG-A) şi Galß1-6Galß1-3'DAG (DGDG-B) ca diglicozil-diacilglicerol; Galß1-6Galα1-6Galß1-3'DAG (TGDG-A) şi $(Galß1-6)_2$-Galß1-3'DAG (TGDG-B) ca triglicozil-diacilglicerol; $(Galß1-6)_2$-Galα1-6Galß1-

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

3'DAG (TeGDG-A) şi (Galß1-6)$_2$-Galß1-3'DAG (TeGDG-B) ca tetraglicozil-diacilglicerol. Randamentele de izolare a MGDG, DGDG, TGDG şi TeGDG au fost, respectiv următoarele: 163, 332, 97 şi 8 mg din 10 kg de seminţe de fasole Adzuki. Raportul dintre izomerii A şi B a fost determinat prin două metode: prin CSS pe silicagel-borax a derivaţilor obţinuţi prin deacilare şi acetilare (izomerul A a migrat totdeauna mai rapid decât izomerul B) şi prin GLC a produşilor deacilaţi şi derivatizaţi ca eteri TMS. Au fost obţinute următoarele valori pentru raportul A:B: 68:32 pentru DGDG, 25:75 pentru TGDG şi 14:86 pentru TeGDG.

Gangliozidul GM1a s-a dovedit a fi un nou agent farmacologic pentru tratamentul leziunilor cerebrale. O acumulare apreciabilă de rezultate experimentale a demonstrat că o serie de parametri ai funcţionării creierului de la animalele care au suferit leziuni ale SNC sunt influenţaţi pozitiv prin administrare parenterală de gangliozid GM1a. Mecanismul cheie prin care acest monosialogangliozid îşi exercită efectele clinice este de a mări neuroplasticitatea SNC. Efectul de recuperare este mediat prin intermediul activităţilor neuroprotectoare şi neuronotrofice exercitate sau potenţate de către gangliozidul GM1. Activitatea neuroprotectoare se bazează pe prevenirea consecinţelor neuronotoxice cauzate de către activarea excitatorie şi indiscriminatorie a receptorului aminoacizilor, îndeosebi ai glutamatului. Experimente *in vitro* şi *in vivo* au indicat că produsul creşte răspunsul trofic al neuronilor la factorii neuronotrofici induşi ca răspuns la leziune. Efectele neurofarmacologice ale gangliozidului GM1a la om au fost confirmate în cazuri clinice legate de leziuni ale creierului şi cordului spinal sau în accidente cerebrale. Utilizarea terapeutică a gangliozidului GM1a constituie o inovaţie valoroasă în domeniul neurofarmacologiei, care a devenit evidentă odată cu recunoaşterea semnificaţiei funcţionale a neuroplasticităţii SNC.

Leziunile creierului sau cordului spinal, datorate fie traumatismelor fie accidentelor vasculare, constituie a treia cauză majoră a morţii în ţările industrializate şi prima cauză a inabilităţii de durată. Ischemia creierului cu focar acut este cauza directă a aproximativ 10% din cauzele morţii în ţările din Vest. Această maladie este frecventă în special la oamenii în vârstă şi este urmată de eforturi intensive de reabilitare pentru a descreşte malfuncţia neurologică ce urmează accidentului cerebral. Morbiditatea datorată leziunilor SNC are un impact crescător, atât organizatoric cât şi economic, asupra serviciilor din spitale, îngrijirii primare şi comunităţii. De aici necesitatea cercetărilor pentru găsirea unor metode farmacologice care să ducă la recuperare cât mai rapidă în terneni funcţionali şi de calitate a vieţii.

Măsurile terapeutice curente în caz de leziuni ale SNC îşi concentrează atenţia asupra modificărilor fluidului tisular (edemului cerebral) şi a consecinţelor transportului anormal de ioni la nivel celular. Compuşii utlizaţi pentru a contracara anormalităţile fluidului tisular au mai ales un mecanism fizico-chimic iar nivelul farmacologic de acţiune este mai puţin atins; de ex., osmoza realizată cu ajutorul manitolului. Utilizarea steroizilor sau barbituricelor poate fi cu greu justificată în astfel de situaţii. În ischemia cerebrală acută, ţintele farmacologice sunt maladia trombotică şi perturbarea hemodinamică.

Cercetarea neurobiologică actuală este direcţionată spre potenţialul de reparare al ţesutului nervos care a suferit leziuni. Cercetările respective aruncă o lumină nouă asupra mecanismelor adaptative care sunt activate în vederea restaurării funcţiei. În cursul acestor cercetări au ieşit la lumină proprietăţi neurofarmacologice surprinzătoare ale gangliozidelor. Gangliozidele sunt constituenţi ai membranelor şi sunt deosebit de abundente în sistemul nervos. Gangliozidele endogene au un rol în multe procese fiziologice care au loc pe membrană sau în vecinătatea mebranei plasmatice a celulei. Gangliozidele administrate exogen sunt absorbite de către neuroni iar dinamica funcţională a membranei celulare este influenţată în multiple feluri.

Un reprezentant tipic al gangliozidelor din celula nervoasă este gangliozidul GM1a. Acest gangliozid prezintă proprietăţi farmacologice unice când este adăugat la culturi de celule nervoase sau când este administrat animalelor de laborator cu leziuni ale sistemului nervos.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Imunoterapia activă a tumorilor de tip melanoma a pornit de la constatarea că serul pacienţilor cu melanoma conţine anticorpi care reacţionează cu antigenii membranari de pe suprafaţa celulelor afectate (Morton şi colab., 1968). La scurtă vreme după aceasta s-a relatat că injectarea intratumorală de *Bacillus* Calmette-Guerin (BCG) în metastazele melanoame cutanee a mărit imunitatea sistemică, după cum a rezultat din creşterea titrului anticorpilor antimelanoma şi din regresia clinică a metastazelor neinjectate din piele la 17% din pacienţi (Morton şi colab., 1974). Biopsia leziunilor melanoma neinjectate au arătat o infiltrare limfocitică intensă. Prima etapă a imunoterapiei active a constat în injectarea intradermală a unui vaccin tumoral de celule întregi constând din celule melanoma allogeneice iradiate şi amestecate cu BCG (Morton şi colab., 1978; 1987). În urma acestui vaccin o treime din pacienţi au prezentat un titru crescut de anticorpi IgM reactivi faţă de antigenii membranari melanoma. Mai important încă a fost faptul că pacienţii respectivi au supravieţuit un timp mai lung (Jones şi colab., 1981).

Identificarea gangliozidelor ca antigeni posibili ai membranei celulare a fost sugerată de faptul că antigenii asociaţi cu melanoma şi recunoscuţi de către anticorpii IgM se găseau în ţesuturile neurale din creierul fetal bogate în gangliozide (Irie şi colab., 1976, 1979). Aceşti antigeni au fost numiţi antigeni imunogeni oncofetali, pentru a indica imunogenicitatea lor la om (Sidell şi colab., 1979, 1979, 1980). Ulterior s-a constatat că complexul antigen oncofetal constă din doi epitopi reactivi distincţi (Irie et al., 1982; Rees et al., 1981). Antigenii respectivi au fost apoi identificaţi ca gangliozide GM2 (Tai şi colab 1983) şi GD2 (Cohen et al., 1982) prin evidenţierea reacţiei lor cu anticorpii monoclonali umani specifici produşi prin transformarea virusului Epstein-Barr al limfocitelor sanguine periferice de la pacienţi cu melanoma (Irie şi colab., 1981, 1982). S-a găsit apoi că anticorpii IgM, cu concentraţie crescută în serul pacienţilor imunizaţi cu TCV, au reacţionat preferenţial cu GM2 şi GD2 (T. Tai şi colab., 1985). Dovada directă a importanţei GM2 şi GD2 ca antigeni ţintă pentru imunoterapie a provenit din observaţia că anticorpii monoclonali umani faţă de aceste două gangliozide au indus regresia metastazelor melanoma cutanate umane numai dacă melanoma posedă antigenii gangliozidici corespunzători (Irie et al., 1986, 1989). A urmat îmbunătăţirea vaccinului prin utilizarea liniilor celulare melanoma allogeneice polivalente selecţionate specific pentru concentraţia lor înaltă în GM2 şi GD2. Vaccinul celular melanoma îmbunătăţit conţine deasemenea OAcGD3, care este deasemenea un gangliozid imunogenic important (Ravindranath et al 1989). Un vaccin MCV polivalent bogat în gangliozide a avut consecinţe importante la pacienţii cu melanoma metastatică avansată: la anumiţi pacienţi melanoma metastatică a regresat iar prelungirea supravieţuirii a fost triplă (Morton et al., 1992).

6.10.1. Acţiuni fiziologice ale sulfo-glicosfingolipidelor

Particularităţile chimice care determină comportarea moleculară a sulfatidului şi seminolipidului în biomembramne sunt următoarele:

- gruparea polară galactozil 3- sulfat conţine o sarcină negativă astfel că poate interacţiona cu cationi şi zone bazice ale proteinelor din mediul extracelular;
- grupările hidroxil libere şi legătura amidică din fragmentul ceramidic al sulfatidului îl conferă acestei molecule un potenţial de legare prin legături de hidrogen intermoleculare în zona intermediară a moleculei. Acest potenţial estre mai scăzut în cazul seminolipidului;
- speciile de sulfatid din mielină conţin o proporţie ridicată de acizi graşi saturaţi şi mononesaturaţi cu catenă foarte lungă (C22-C26). Astfel aceste catene N-acil sunt mult mai lungi decât catena sfingozinei şi decât catenele O-acil ale fosfolipidelor din mielină; Consecinţa este că sulfatidul prezintă legături speciale în cadrul biomembranelor. Din contra, seminolipidul având fragmentul hidrofob simetric nu prezintă astfel de legături.
- Din punct de vedre chimic, legătura amidică şi legătura eterică sunt mult mai stabile decât legătura ester. Astfel, gliceridele sunt complet hidrolizate prin incubare timp de o oră la 37°C

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

- în KOH 0,1 M în timp ce legăturile amidă şi eter din sulfatid şi respectiv seminolipid rămân intacte. Această stabilitate chimică este deasemenea reflectată la nivel enzimatic. Lipazele care hidrolizează legăturile ester sunt întâlnite mult mai frecvent decât enzimele care clivează legăturile amidice şi legăturile eterice.

Sulfolipidele poartă o sarcină negativă şi pot lega prin aceasta o sarcină pozitivă din catena laterală a unor aminoacizi (Arg$^+$, His$^+$, Lys$^+$) de pe suprafaţa unei proteine. Acest tip de interacţie poate fi intensificată prin legături de alt tip ca de ex., legături tip lectină datorate interacţiilor glucidice. Au fost identificate o serie de proteine care leagă sulfolipidele (Tabelul 65). Afinitatea a fost măsurată fie prin adsorbţia prealabilă a proteinei radiomarcate pe pereţii unor vase de plastic fie prin adsorbţia sulfolipidului pe silicagel. Extrapolarea acestor rezultate la interacţiile *in vivo* trebuie făcută cu prudenţă deoarece lipidele integrate în biomembrane interacţionează într-un mod diferit. Criteriile utilizate pentru a defini legarea specifică a sulfo-GalCer de către laminină, trombospondină şi factorul Von Willebrand au fost următoarele: (i) alte lipide anionice (fosfolipide, gangliozide, colesterol sulfat) precum şi lipidele neutre să fie legate foarte slab sau deloc; (ii) îndepărtarea grupării sulfat din sulfo-GalCer să ducă la pierderea capacităţii de legare. Aceasta nu exclude recunoaşterea de către proteinele respective a seminolipidului sau altor glicoconjugate sulfatate (glicozaminoglicani ca de ex., heparina sau glicoproteinele sulfatate); sulfoglicolipidele mai complexe se leagă deasemenea la laminină. Există dovezi indirecte dar convingătoare ale asocierii sulfo-GalCer cu receptorul pentru opiu şi cu sistemul de transport Na^+, K^+ al ATPazei.

Un alt domeniu promiţător de cercetare îl constituie rolul sulfolipidelor ca liganzi pentru proteinele din matrix-ul extracelular şi pentru receptorii celulari de aderiune. În proteine relativ neînrudite (trombospondina, properdina, unii factori ai complementului, proteinele din învelişul sporoitului malariei) a fost găsită o secvenţă comună: Cys-Ser-Val-Thr-Cys-Gly- . Antistatina, o proteină salivară la lipitoare, conţine acelaşi motiv structural iar secvenţa -Cys-Ser-Val-Thr-Cys-Gly-X-X-X-Arg-X-Arg- este considerată ca un domeniu peptidic conservat pentru legarea glicoconjugaterlor sulfatate. Secvenţa –Trp-Ser-X-Trp- din thrombospondină este deasemenea implicată în legarea glicoconjugatelor sulfatate. Deoarece acest motiv structural nu conţine nici un aminoacid bazic, s-a sugerat existenţa unei interacţii specifice între inelul aromatic plat al Trp şi inelul glucidic al glicoconjugatelor.

Tabelul 65. Proteine conţinând domenii de legare pentru sulfogalactolipide

Proteine adezive din matricea extracelulară
Laminină
Trombospondină
Citotactină (tenascină, glicoproteina J1)
Factorul Von Willebrand (adezivitatea şi agregarea plachetelor)
Receptori de adeziune
P-selectină (direcţionarea limfocitelor şi alte funcţii)
L-selectină
Amfoterină (proteină de 30 kDa din creier de şobolan) Molecula asociată creşterii care leagă heparina (18kDa)
SLIP-1 (proteina de 70 kDa care leagă sulfogalactolipidul)
Proteina circumsporozoitului malariei
Proteina învelişului virusului HIV (Gp-120)
Coagularea sângelui şi activarea complementului
Factorul XII (activarea de contact a coagulării sângelui)

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Kininogen
Antistasină (anticoagulantul salivar de 15 kDa al lipitorii, inactivează factorul Xa)
Properdină (stimulează calea alternativă a complementului; C3 convertază)

Transportul şi degradarea lizozomală
Proteine de transport a glicolipidelor
Saposine, proteine care activează sulfataza

Alte acţiuni
Endorfină (agonistul receptorului opioid)
Proteinaza non-lizozomală, multicatalitică, cu masă moleculară înaltă

6.11. Ancore de membrană şi glicolipide ale paraziţilor

Este aproape sigur că cele două aspecte, ancorele de membrană şi glicolipidele paraziţilor, vor fi tratate separat, pe măsură ce datele experimentale vor dezvălui noi faţete ale diversităţii structurale şi funcţionale ale glicolipidelor. În momentul de faţă însă, cele două subiecte prezintă un apreciabil grad de suprapunere, după cum se va vedea din cele ce urmează.

6.11.1. Ancore de membrană GPI

Ancorele de membrană pe bază de glicozilfosfatidil inozitol (GPI) au o distribuţie universală la eucariote şi sunt utilizate de către o largă varietate de glicoproteine la suprafaţa celulară. Ancora GPI poate fi considerată ca o alternativă la domeniile polipeptidice transmembranare hidrofobe de ancorare. Se cunosc actualmente o serie de aspecte privind biosinteza şi funcţiile GPI (M. A. J. Ferguson şi A. F. Williams, 1988; G. A. M. Cross, 1990; M. A. J. Ferguson şi colab., 1991). Astfel au fost găsite cinci structuri tip ancoră GPI pentru proteine:
- varianta glicoproteică de suprafaţă tip *Trypanosoma brucei*;
- antigenul Thy-1 din creier de şobolan;
- acetilcolinesteraza din eritrocite umane;
- proteaza de suprafaţă din promastigotul *Leishmania major*;
- antigenul 1G7 din *Trypanosoma cruzi*.

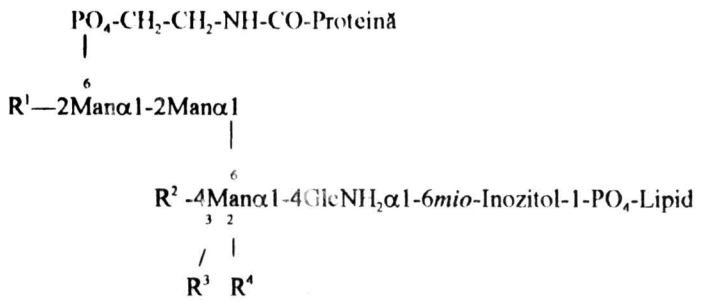
Corelarea structurilor de mai sus a indicat regiunile conservate şi regiunile variabile (Fig 30). Au mai fost definite o serie de glicofosfolipide înrudite provenite de la parazitul *Leishmania* şi *Trypanosoma cruzi*. Aceste glicofosfolipide, cu toate că nu au corespondenţă în eucariotele superioare, sunt integrate în familia de structuri GPI deoarece conţin motivul structural Manα1-4GlcNH$_2$α1-6*mio*-inozitol-1-PO$_4$-lipid. Elucidarea structurii ancorelor GPI se bazează atât pe strategii proprii cât şi pe tehnici împrumutate din cercetarea glicoconjugatelor. Se utilizează frecvent în studiile GPI: RMN bidimensională de înaltă rezoluţie, cuplul GC-MS, cromatografia în fază lichidă, metodele chimice, etc.

6.11.2. Glicolipide ale paraziţilor

Studiile chimice anterioare au vizat îndeosebi lipidele (de la larvele de *Taenia taeniaeformis*) (G. L. Mills şi colab., 1983) şi metabolismul acestora (*Schistosoma mansoni* şi *Dugesia dorotocephala)* (F.Meyer şi colab., 1970)

Un studiu cantitativ asupra încorporării 1-[^{14}C]-acetatului în lipidele parazitului nematod intestinal *Trichuris globulosa* a relevat prezenţa GSL neutre (GlcCer), precum şi a GSL acide ca

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



Ancora GPI	R^1	R^2	R^3	R^4	Fragment lipidic
1.GSV* *T. brucei*	OH	OH	Galαf**	OH	Diacil-glicerol
2.PSP *L. Major*	OH	OH	OH	OH	Alkil/acil-glicerol
3. Thy-1, şobolan	Manα	GalNAcß	OH	EtNP	n.d.
4.AChE uman	OH	OH	OH	EtNP	Alkil/acil-glicerol
5.1G7 *T. cruzi*	Manα	OH	OH	OH	n.d.

Fig. 30. Structurile ancorei GPI; * prescurtările sunt următoarele: GSV, glicoproteina de suprafaţă, varianta *T. b.*; f, inel furanozic; PSP, proteaza de suprafaţă a promastigotului; AChE, acetilcolin esterază; n.d., nedeterminat, EtNP, etanolamin-fosfat.

de ex. gangliozidele şi sulfatidele (esterul sulfuric al GalCer). Gangliozidele sunt prezente în concentraţii foarte joase, aproximativ 0,14% din lipidele totale. Persat şi colab., (1992) au investigat GSL neutre de la parazitul *Echinococcus multilocularis* în stadiul de metacestod; au fost descrise cu această ocazie patru glicolipide din seria neogala şi două glicolipide conţinând fucoză, şi anume Fucα1-3Galß1-6GalCer şi Galß1-6(Fucα1-3)Galß1-6GalCer.

Nishimura şi colab., (1991) au studiat în detaliu GSL de la tenia *Metroliastes coturnix* şi au elucidat eterogenitatea moleculară din fragmentul ceramidic. GSL major a constat dintr-o serie de mono-, di-, tri- şi tetragalactozil-ceramide (numite GL1-GL6). GL1 şi GL2 sunt ambele monogalactozilceramide dar se deosebesc prin prezenţa unei grupări hidroxil suplimentare în molecula ultimei; digalactozil-ceramidele GL3 şi GL4 se deosebesc în acelaşi fel. GL4 a fost caracterizat ca fiind Galα1-4GalCer (galabiozilceramid), GL5 este Galß1-6Galß1-6GalCer (neogalatriaozilceramid) iar GL6 este Galß1-6Galß1-6Galß1-6GalCer (neogalatetraozilceramid). Ceramidele constituente ale acestor GSL sunt alcătuite îndeosebi din C_{18}-C_{20} sfinganină sau 4-D-hidroxisfinganină. CL combinată cu SM-BAR au fost utilizate pentru a determina distribuţia speciilor moleculare de ceramide în glicolipidul parazitului. Această ditribuţie era diferită de cea găsită pentru ceramidele intestinului prepeliţei gazdă, furnizând presupunerea că ceramidele gazdei nu sunt reutilizate *en bloc* de către parazit pentru biosinteza lipidelor proprii.

Recent, Dennis şi colab., (1992) au izolat GSL din seria neogala de la metacestode provenite de la viermele panglică a vulpii, *Taenia crassiceps.*

Pentru a determina măsura în care GSL de la *S. mansoni* (gălbeaza din sângele uman) sunt înrudite cu GSL a gazdei, Makaaru şi colab., (1992) au marcat metabolic cu izotopi radioactivi paraziţii adulţi fie cu [^{3}H]-galactoză fie cu [^{3}H]-glucozamină. S-a găsit că GSL majore din parazit sunt GalCer şi GlcCer. Constituenţii obişnuiţi ai celulelor vertebratelor, ca de ex., LacCer, gangliozidele şi GSL fucozilate, erau absente. Astfel, rezultatul de la *S. mansoni* şi cel de la *M. coturnix*, sprijină concluzia că paraziţii nu îşi procură glicoconjugatele proprii de la gazdă. A fost izolat şi caracterizat un GSL nou, GalNAcß1-4GlcCer; autorii au presupus că fracţiunea

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

oligozaharidică ar putea reprezenta un nou tip de serie de GSL, şi au numit provizoriu această structură ca "schistocor".

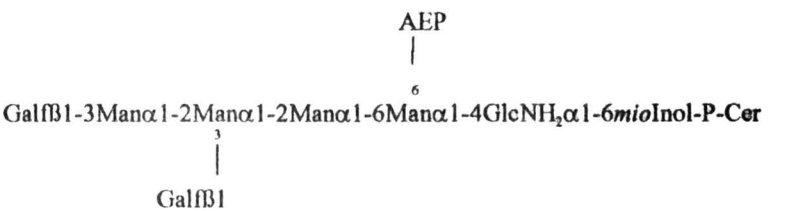
Levery şi colab., (1992) au caracterizat din acelaşi trematod parazitar un GSL cu fucoză căreia i s-a atribuit următoarea structură probabilă: Fuc1-4(Fuc1-3)GlcNAc1-2Fuc1-4(Fuc1-3)GlcNAc1-2Fuc1-4(Fuc1-3)GlcNAc1-2Fuc1-4(Fuc1-3)GlcNAc1-3GalNAc1-3GalNAc1-4GlcCer. Autorii sugerează că epitopul care conţine fucoză, constând din unităţi repetitive Fuc-GlcNAc, ar putea servi ca ţintă pentru imunodiagnoza specifică parazitului şi pentru terapie.

Metacestodele parazitului *Echinococcus multilocularis* conţin următoarele gangliozide: GM1, GM3, GD1a, GM2 (F. Persat şi colab., 1994).

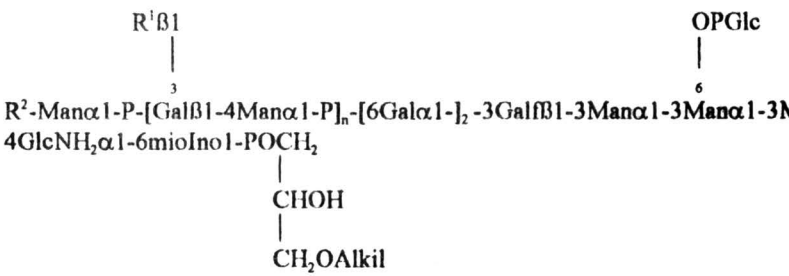
S-a demonstrat că adulţii de *Schistosoma mansoni* sintetizează un dihexozil-ceramid nou, GalNAcß1-4Glcß1-1'Cer; compusul a fost numit schisto (C. K. Makaaru şi colab., 1992).

Patru glicolipide majore au fost extrase din tachyzoiţi de *Toxoplasma gondii* care erau marcaţi metabolic cu următorii compuşi tritiaţi: glucozamină, manoză, acid palmitic, acid miristic, etanolamină şi inozitol. Luînd în considerare comportarea glicolipidelor faţă de o serie de teste enzimatice şi chimice rezultă că ele au următoarele proprietăţi comune cu fracţiunea glicolipidică din ancora glicozil-fosfatidil-inozitol (ancora GPI) din proteina majoră de suprafaţă P30 din *Toxoplasma gondii*: (1) o legătură glucozamină (neacetilată)-inozitol-fosfat; (2) sensibilitate faţă de fosfolipaza C, specifică fosfatidil-inozitolului, şi faţă de acidul nitros; (3) identitatea scheletului glican a GPI defosforilat cu HF şi a glicanului miez obţinut prin defosforilare cu HF a GPI din proteina majoră de suprafaţă P30; (4) prezenţa unei structuri glican liniare blocate de un rest etanolamin fosfat. Rezultă din datele de mai sus că glicozil-fosfatidil-inozitolii de mai sus sunt implicaţi în biosinteza ancorelor de membrană GPI de la *T. gondii* (S. Tomavo şi colab., 1992).

Epimastigoţii de *T. cruzi* conţin o varietate remarcabilă de lipo-peptido-fosfo-glicani (LPPG); unul dintre aceştia are următoarea structură:



Spre deosebire de acesta, lipopeptidoglicanul (LPG) din promastigoţi de *Leishmania* are capătul hidrofob de tip alkil-glicerol:



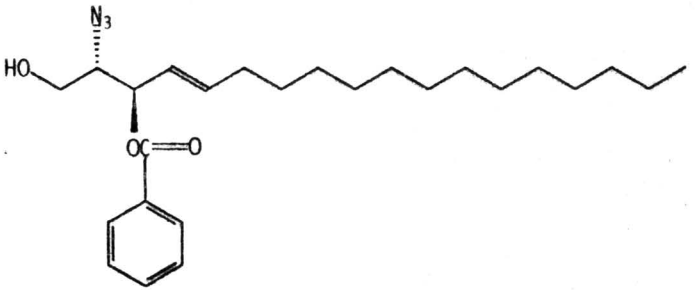
(R^1 este H, sau Glc, sau Gal sau un oligozaharid; R^2 este Manα1-2 sau un oligozaharid.)

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

7. SINTEZA CHIMICĂ A GLICOSFINGOLIPIDELOR

În cadrul progreselor spectaculoase ale Chimiei Organice, sinteza GSL a constituit o realizare de excepţie. După cum rezultă din literatura de specialitate, mai multe laboratoare au realizat sinteza totală a acestor compuşi.

O etapă importantă a sintezei GSL a constituit-o sinteza sfingozinei; aceasta a fost efectuată de către mai mulţi cercetători: C. A. Grob şi colab., (1951); D. Shapiro şi colab., (1958, 1963); Stoffel şi Sticht (1967). Aceste sinteze sunt importante pentru confirmarea structurii sfingozinei şi pentru unele investigaţii metabolice. Ulterior au fost elaborate metode de sinteză ale sfingozinei precis direcţionate în vederea legării stereoselective şi regioselective cu fracţiunea oligoglucidică (H.-E. Radunz şi colab., 1988; T. Bar şi R. R. Schmidt, 1988; A. Hasegawa şi colab., 1993). Un astfel de compus intermediar este (2S,3R,4E)-2-azido-3-O-benzoil-4-octadecenă-1,3-diol:



Condensarea azidoderivatului cu un derivat oligoglucidic precede introducerea grupării acil gras.

GSL cu structură mai simplă au fost obţinute în cursul primelor tentative: (2S,3R,4E,8Z)-1-O-(ß-D-glucopiranozil)-N-((2'R)2'-hidroxihexadecanoil)-4,8-sfingadienina (S. Kodato şi colab., 1989) (Fig. 31) precum şi cerebrozide conţinând (4E,8E)- sfingadienină (T. Bar

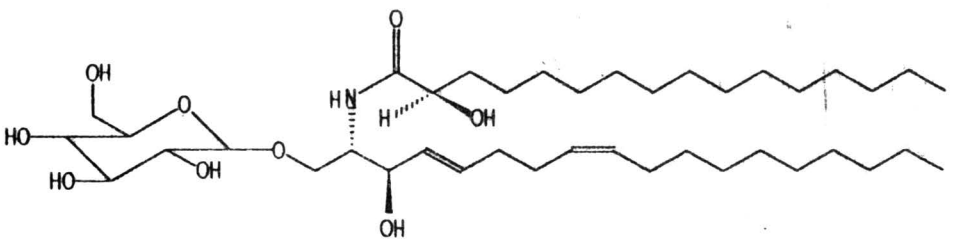


Fig.31.(2S,3R,4E,8Z)-1-O-(ß-D-glucopiranozil)-N-((2'R)2'-hidroxihexadecanoil)-4,8-sfingadienină.

şi R. R. Schmidt, 1988). Au urmat: gangliozidul GD3 (A. Hasegawa şi colab., 1993; H. Ishida şi colab., 1993), gangliozidele GM1a şi GD1a (A. Hasegawa şi colab., 1993), gangliozidele KDN-

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

GM4 şi KDN-GM3 (T. Terada şi colab., 1993), cei doi constituenţi ai sialosil-paraglobozidului (NANAα2,3- şi NANAα2-6-) (J. J. Gaudino şi J. C. Paulson, 1994), sialil Lewis X şi sialil Le X-Cer (Fig. 32) (A. Kaneyama şi colab., 1991; A. Hasegawa şi colab., 1992), holotoxina A, o saponină izolată din castravetele de mare *Stichopus japonicus* (X.-B. Han şi colab., 1993) (Fig. 33).

Sinteza chimică a glicolipidelor vizează două direcţii: pe de o parte sinteza glicolipidelor naturale, iar pe de altă parte sinteza neoglicolipidelor, glicolipide ce posedă agliconi artificiali. Dezvoltarea rapidă a metodelor eficiente pentru realizarea legăturilor glicozidice interzaharidice au dus la sinteza glicolipidelor foarte complexe conţinând până la 15 unităţi monozaharidice. Utilizarea azidosfingozinei ca element de construcţie (P. Zimmerman şi R. R. Schmidt, 1988; M.Kiso şi colab., 1986), în etapele finale ale secvenţelor lungi de sinteză, este o modalitate eficientă, îndeosebi în activarea cu tricloroacetimidat a poziţiei anomere (R. R. Schmidt, 1989). Ca un complement al metodelor chimiei organice, sinteza enzimatică bazată pe sialiltransferaze este utilă pentru glicozilarea stereoselectivă cu derivaţi ai AS (Y. Ichikawa şi colab., 1992).

Majoritatea sintezelor recente ale glicosfingolipidelor s-au bazat pe cuplarea unui derivat al Sph cu un fragment oligozaharidic de sinteză. Glucidele semiacetalice pot fi activate pentru glicozilare prin transformare în: 1-O-acil-, 1-halogeno- sau 1-tricloroacetimidoato-glucide (R. R. Schmidt, 1986). Cele mai utile grupări de protecţie anomere sunt: benzil, alil şi 2-(trimetil-

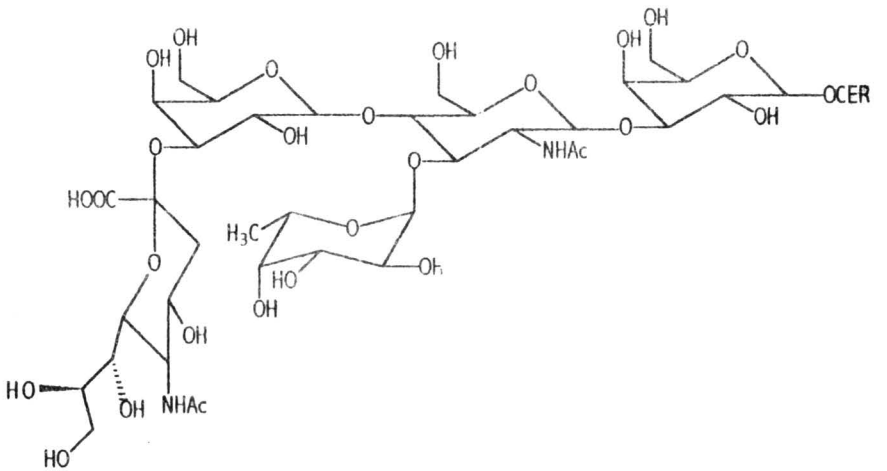


Fig. 32.Sialil Lewis X ceramid.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

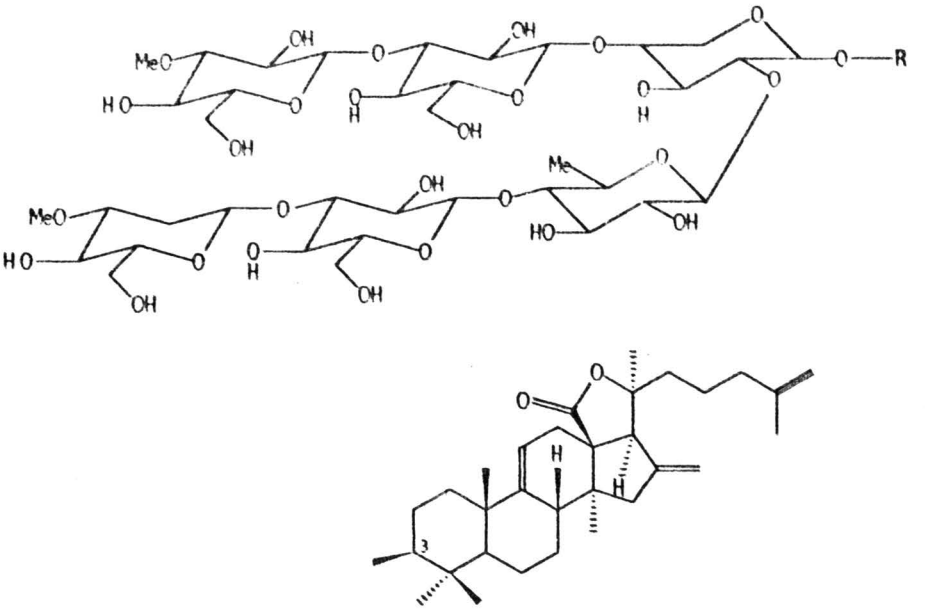


Fig. 33.Holotoxina A (fragmentul R este compusul steroidic indicat care se leagă la oligoglucid printr-o legătură glicozidică la C-3).

silil)etil, deoarece acestea pot fi îndepărtate cu randament mare în urma altor reacţii (T. Ogawa şi H. Yamamoto, 1985; K. Jansson şi colab., 1988; G. Magnusson, 1992). Globotriaozil- ceramidul (Gb3Cer) a fost obţinut prin cuplarea ceramidului cu globotriaoza activată cu trifluoroacetamido- sau fluorderivat (K.Koike şi colab., 1987). Protecţia în poziţia I^2 (adică la C-2 a primului glucid dinspre ceramid) cu pivaloil în loc de acetat a mărit randamentul prin evitarea formării derivatului 1,2-ortoester (S. Sato şi colab., 1988). Utilizarea azidosfingozinelor protejate a mărit randamentul reacţiilor de glicozilare. Această cale necesită însă etape suplimentare (reducerea azidei şi N-acilare), micşorând randamentul global, dar metoda prezintă avantajul introducerii AG cu structura dorită. Reducerea grupării azido-Sph s-a realizat cu H_2S (P. Zimmerman şi colab., 1988; T. Murase şi colab., 1989), trifenilfosfină (K. C. Nicolaou şi colab., 1990 sau $[Et_3N][Sn(SPh)_3]$ (M. Bartra şi colab., 1987; K. C. Nicolaou şi colab., 1990), ducând la lizo-derivatul corespunzător. Ruta derivaţilor azido-Sph a fost utilizată pentru sinteza glicolipidelor din familia grupului sanguin Lewis (A. Hasegawa şi colab., 1992; A. Toepfer şi R. R. Schmidt, 1992; K. C. Nicolaou şi colab., 1992). (Compuşii respectivi au generat interes considerabil printre chimişti şi biologi datorită capacităţilor de a lega selectinele celulelor endoteliale (A. Aruffo, 1992; K. A. Karlsson, 1991), polarizând prin aceasta leucocitele în zona inflamaţiei).

Sinteza gangliozidelor a fost condiţionată de elaborarea unor metode de sialosilare cu randament ridicat. Un grup de cercetători japonezi au iniţiat utilizarea donorilor glicozil de AS conţinând o grupare tiofenil auxiliară în poziţia 3 (Y. Ito şi T. Ogawa, 1988). Astfel de donori dau un randament înalt şi o valoare ridicată a raportului α/ß în reacţiile de glicozilare. Gruparea tiofenil a fost îndepărtată ulterior prin reducere cu hidrură de staniu . Metoda a fost utilizată pentru sinteza gangliozidului GD3, când a servit ca sinton o grupare disialosil (Y. Ito şi colab.,

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

1989). Același sinton a fost utilizat pentru sinteza gangliozidului GQ1b (Y. Ito și colab., 1992). Un lactozid având grupările hidroxil 2', 3' și 4' neprotejate a fost sialosilat în poziția 3' cu derivatul S-glicozil xantat al AS protejat cu grupări acetil, în cursul sintezei gangliozidului GM3 (H. Lonn și K. Stenvall, 1992). Derivatul lactam al gangliozidului GM3 a fost produs prin sialosilarea cu același reactiv a 2'-azido-lactozidului neprotejat în pozițiile 3' și 4' (A. K. Roy și colab., 1992).

Prin glicozilarea lactozei (ca 2-(trimetilsilil)etil, având libere numai grupările hidroxil din pozițiile 3' și 4'), cu derivatul 2-tiofenil al fragmentului disialosil și grefarea fracțiunii ceramidice a rezultat gangliozidul GD3 (H. Ishida și colab., 1993; A. Hasegawa și colab., 1993). Fragmentul lactozil a fost sintetizat din derivați monohexozil corespunzători iar fragmentul disialosil (ca ester metilic, protejat ca acetat și 1', 9 lactonă) a fost obținut din acid colominic (R. Roy și R. A. Pon, 1990). Glicozilarea unei fracțiuni glucidice (identică cu porțiunea oligozaharidică a gangliozidului GM2) cu un derivat al GA2, activat anomer cu o grupare tiometil, a dus la obținerea fragmentului oligoglucidic a gangliozidului GM1. Glicozilarea aceleiași fracțiuni glucidice cu un derivat al sialosil-galactozei a produs fragmentul oligozaharidic al gangliozidului GD1a. Grefarea azido-Sph pe cele două fragmente oligozaharidice urmată de reducere, acilare și îndepărtarea grupărilor protectoare, a servit la sinteza chimică a gangliozidelor GM1a și GD1a (A. Hasegawa și colab., 1993). Deoarece gruparea sulfat are un volum mai mic decât o grupare glicozil, sinteza glicosfingolipidelor sulfatate a necesitat o mai mare precizie a sintezei stereoselective și regioselective. În acest cadru au fost sintetizate două glicosfingolipide sulfatate pe fragmentul glucuronil:

HO_3S-3GlcApβ1-3[Galpβ1-4GlcNAcpβ1-3]$_n$Galpβ1-4Glcpβ1-1'Cer

(n=1,2; p indică inelul piranozic) (T. Nakano și colab., 1993). Compușii respectivi fuseseră izolați din țesutul nervos periferic uman (K. H. Chou și colab., 1986).

În cadrul reacției de glicozilare, unitatea monozaharid sau oligozaharid este activată la atomul de carbon glicozidic ce urmează să fie legat la aglicon. În Tabelul 66 sunt prezentați câțiva astfel de substituenți și modul lor de activare.

Tabelul 66. Donori de resturi glicozidice și modul lor de activare.

Donor glicozil	Activator	Comentariu
-Br	Br^-, $Hg(CN)_2$, $HgBr_2$, AgOTf	Cel mai des folosit ca donor. Viteza de reacție poate fi modulată prin alegerea activatorului.
-Cl	$Hg(CN)_2$, $HgBr_2$, AgOTf	Mai stabil și mai puțin flexibil decât bromura.
-F	$SnCl_2$-$AgClO_4$, AgOTf-$HfCp_2Cl_2$, AgOTf-$SnCl_2$, Tf_2O-$HfCp_2Cl_2$, Tf_2O	Donori eficienți în condiții blînde, reacționează cu tioglicozizii cu randamente excelente.
-SR	DMTST, TfOH-NIS, IDCP	Rapid, cu randament înalt, și stereoselectiv
-OAc	BF_3, $SnCl_4$, TMSOTf	Condiții blânde
-$(CH_2)_3CH{=}CH_2$	IDCP, TfOH-NIS, AgOTf-NIS, TESOTf-NIS	Reacție instantanee, reactivitate controlată prin promotor adecvat.
-$C(=NH)Cl_3$	BF_3-Et_2O	Condiții blânde de reacție și randamente bune
-SOPh	Tf_2O	Glicozilare rapidă a acceptorilor nereactivi.
-SCN	TPMP, TMSOTf	Stereoselectiv, favorizând cuplarea 1,2-*cis*
S ‖ -S-C-OEt	DMTST, $Cu(OTf)_2$	Dă amestecuri α/β la randamente bune.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

$^4C_1$-piranozil PTS, TMSOTf Stereoselecti , favorizând cuplarea 1,2-*trans*.

Cele mai recente preocupări ale cercetătorilor din domeniul glicoconjugatelor vizează sinteza organică a glicoproteinelor; în acest sens au fost rezolvate, în cea mai mare parte, problemele legate de stereospecificitatea şi regioselectivitatea reacţiei de glicozilare respective (A. Hasegawa şi colab., 1998).

Oxidarea 4,6-O-izopropiliden metil-α-D-glucopiranozidului la 2-dicarboxilat , pe diferite căI, a fost utilizată ca model pentru amidon. Cel mai bun oxidant pentru legătura $C_2 - C_3$ s-a dovedit a fi RuO_4, preparat *in situ* prin oxidarea unei cantităţi catalitice de Ru-III cu NaOCl (S. J. H. F. Arts şi colab., 1994).

Sinteze de fuco-gangliozide şi fuco-lipide. Fuco-gangliozidul sialil Lewis X a fost izolat din rinichi uman (H. Rauvala, 1976) iar ulterior s-a constatat că este un gangliozid antigen frecvent asociat tumorilor (K. Fukushima şi colab., 1984). Structura acestui glicosfingolipid este următoarea: NeuAcα2-3Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ1-1'Cer.

Grefarea regio- şi α-stereo-selectivă a acidului sialic a constituit un aspect esenţial în sinteza gangliozidelor. α-Glicozilarea eficientă cu acid sialic se realizează în următoarele condiţii (T. Murase şi colab., 1988; A. Kameyama si colab., 1991):
- se utilizează dimetil(metiltio)sulfonium triflat (DMTST) ca promotor;
- donor glicozil este metil 2-tioglicozidul acidului sialic;
- acceptorii glicozil (galactoza, lactoza, etc) sunt protejaţi corespunzător;
- procedeul are loc în acetonitril în condiţii controlate cinetic.

În cadrul sintezei fuco-gangliozidului sialil Lewis X, s-a pornit de la 4,6-O-Bzd-D-GlcNAcpß1-3-O-(2,4,6-tri-O-Bn)-D-Galpß1-4-O-(2,3,6-tri-O-Bn)-D-Glcpß1-SE (unde: Bzd este benziliden; Bn, benzil; Bz, benzoil; SE, $Me_3SiCH_2CH_2$-; p, piranozil). Fucozilarea s-a realizat cu metil 2,3,4-tri-O-Bn-1-tio-ß-L-Fucp care a fost sintetizat astfel: gruparea acetoxi anomeră din tetra-O-Ac-L-Fuc a fost înlocuită cu o grupare tiometil [(metiltio)trimetilsilan], O-deacetilare şi O-benzilare. Prezenţa fucozei în tetrazaharidul obţinut a fost confirmată prin RMN datorită următoarelor semnale: un dublet de trei protoni la δ 0,84 ($J_{5,6}$ 6,4 Hz, CH_3CH) şi un dublet al unui proton la δ 5,07 ($J_{1,2}$ 3,6, Hz, H-1), caracteristice unităţii α-fucopiranozil. Glicozilarea unităţii tetrazaharidice s-a realizat cu 1-O-Me-(4,7,8,9-tetra-O-Ac)Neu5Acα2-3(2,4,6-tri-O-Bz)Galß1-tioMe. Caracteristicile RMN ale derivatului ceramidic al sialil Lewis X sunt următoarele (A. Hasegawa şi colab., 1992):
- 0,92 ppm (t, 6H, $2MeCH_2$)
- 1,05 ppm (d, 3H, $J_{5,6}$ = 6,1 Hz, H-6e)
- 1,30 ppm (s, 52H, 26 CH_2)
- 1,88 ppm, 1,97 ppm (2s, 6H, 2AcN)
- 2,09 ppm (t, 2H, $COCH_2CH_2$)
- 2,84 ppm (dd, 1H, H-3d-eq)
- 4,36 ppm (d, 1H, $J_{1,2}$ = 7,7 Hz, H-1 al Gal)
- 4,76 ppm (d, 1H, $J_{1,2}$ = 6,0 Hz, H-1b)

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

- 4,92 ppm (d, 1H, $J_{1,2}$= 3,1 Hz, H-1e)
- 5,40 ppm (dd, 1H, $J_{4,4}$= 6,8 Hz, $J_{4,5}$= 15,2 Hz, H-4 al Sph)
- 5,60 ppm (dt, 1H, $J_{5,6}$= $J_{5,6'}$= 7,5 Hz, H-5 al Sph)

8.Modificări chimice şi marcarea glicolipidelor

Marcarea cu izotopi radioactivi a BCL. Studiile asupra metabolismului dihidrosfingozinei şi sfingozinei la şobolan au fost precedate de prepararea bazelor sfingozinice cu catenă lungă marcate cu ^{3}H şi ^{14}C. A rezultat astfel că diferite forme enantiomere ale dihidrosfingozinei şi sfingozinei, marcate în catena hidrocarbonată, dau prin degradare acid palmitic, în timp ce dihidrosfingozina marcată [1-^{3}H] sau [1-^{14}C] duce la etanolamină marcată cu ^{3}H şi ^{14}C. Bazele sfingozinice marcate s-au dovedit deasemenea substrate valoroase in studiile *in vitro* asupra mecanismului degradarii şi etapelor biosintezei.Se cunosc actualmente o mare diversitate a modalităţilor de marcare radioactivă a bazelor sfingozinice cu catenă lungă.

8.1.Marcarea dihidrosfingozinei

N-Acil-dihidrosfingozina marcată cu ^{3}H, obţinută din cerebrozide, a fost preparată prin tehnica Wilzbach; însă radioactivitatea este distribuită în acest caz pe toată molecula. [4,5-^{3}H]Dihidrosfingozina a fost obţinută prin reducerea catalitică a sfingozinei în atmosferă de tritiu. Trebuie precizat că introducerea markerului în poziţii specifice ale moleculei poate fi realizată numai prin sinteză totală.

Primele două sinteze utilizate la marcarea dihidrosfingozinei au fost, pe de o parte, cea a lui Grob si colab., şi, pe de altă parte, a lui Shapiro şi colab. Aldehida palmitică marcată cu ^{3}H a fost necesară pentru sinteza treo- şi eritro-dihidrosfingozinei prin metoda lui Grob; clorura de palmitoil marcată cu ^{3}H sau ^{14}C a fost utilizată pentru obţinerea eritro-dihidrosfingozinei prin metoda lui Shapiro şi colab.

Aldehida palmitică marcată cu ^{3}H a fost preparată prin reducerea catalitică a 2-hexadecin-1-al dietil acetal în atmosferă de tritiu; a rezultat [2,3-^{3}H]palmitaldehid dietilacetal iar prin hidroliză acidă şi schimb izotopic complet de α-protoni s-a obţinut [3-^{3}H]-palmitaldehidă. Condensarea acestei aldehide cu nitroetanol a dus la obţinerea de treo-2-nitrooctadecan-1,3-diol (sub formă de cristale şi un amestec de treo- şi eritro-nitrodiol în soluţia mumă. Forma treo a fost redusă la aminodiolul respectiv cu amalgam de aluminiu în eter iar eritro-nitrodiolul a fost transformat mai întâi în derivat eritro-nitrodiol-benziliden. Reducerea cantitativă cu Al/Hg la compusul amino şi hidroliză acidă a dat eritro-dihidrosfingozină. Cele două dihidrosfingozine diastereoizomere sunt cromatografic pure la CSS în sistemul de solvenţi cloroform-metanol-amoniac 2N, 40:10:1 iar derivaţii triacetil sunt identici cu cei relataţi în literatura de specialitate pentru compuşii nemarcaţi. Spectrul IR al derivaţilor triacetil a treo- şi eritro-dihidrosfingozinei diferă numai prin banda de absorbţie medie la 815 cm^{-1} ; deasemenea spectrul lor RMN este aproape identic.

Marcajul [^{3}H] a celor două dihidrosfingozine de la C-5 nu este înlocuibil. Activitatea specifică a rămas constantă în urma metodelor cromatografice (CSS şi CGL) precum şi în urma tratamentului acid şi alcalin. Racematul treo-dihidrosfingozină a fost separat în antipozi optici prin intermediul L-glutamatului dând treo-L(+)-dihidrosfingozină.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

8.2. 3[-^{14}C] şi [1-^{3}H; 3-^{14}C] eritro-DL-dihidrosfingozină

Un mod foarte adecvat pentru sinteza dihidrosfingozinei marcate cu ^{14}C l-a constituit procedeul lui Shapiro şi colab., dar pornind de la acid [1-^{14}C]palmitic. Ultimul a fost preparat printr-o reacţie Grignard între bromură de pentadecil şi $^{14}CO_2$, după care a urmat reacţia cu clorură de tionil pentru a da clorură de [1-^{14}C]palmitoil. C-Acilarea acetoacetatului de sodiu a dus la etil [3-^{14}C]2-acetil-3-oxooctadecanoat care a fost utilizat pentru reacţia Japp-Klingemann. A fost obţinută 2-fenilhidrazona [3-^{14}C]2,3-dioxooctadecanoatului de etil. Acetilarea reductivă, reducerea cu borohidrură de sodiu a grupării oxo şi hidroliza acidă a grupării N-acetil a dat etil [3-^{14}C]-2-amino-3-hidroxioctadecanoat hidroclorură. Acest compus a fost fie redus cu hidrură de litiu şi aluminiu la [3-^{14}C]dihidrosfingozina sau cu $LiAlT_4$ la [1-^{3}H; 3-^{14}C]dihidrosfingozină. Forma eritro pură a fost izolată din ambii compuşi prin intermediul derivatului lor N-dicloroacetil iar baza liberă a fost recuperată prin hidroliza grupării dicloroacetil.

8.3. [7-^{3}H]eritro-DL-Sfingozină

eritro-Sfingozina marcată în catena hidrocarbonată a fost necesară pentru studii biochimice; şi în acest caz a fost utilizată cu succes secvenţa de reacţii a lui Shapiro si colab., care în condiţii strict controlate s-a dovedit o metodă simplă şi valoroasă. Secvenţa de reacţii este aceeaşi ca la prepararea dihidrosfingozinei dar agentul de acilare al acetoacetatului de etil a fost clorura de 2-hexadecanoil. Acidul [5-^{3}H]2t-hexadecenoic a fost sintetizat în felul următor: condensarea 1-iodoundecanului cu dietil acetal de aldehidă propargilică în amoniac lichid, reducerea catalitică a acestui acetal în atmosferă de tritiu la dietil acetal de miristaldehidă, hidroliza acidă a acetalului, care este însoţită de schimbul simultan a doi protoni din poziţia 2, duce la [3-^{3}H]miristaldehidă; aldehida a fost condensată cu acid malonic; prin decarboxilare a rezultat acidul [5-^{3}H]2t-hexadecenoic. Clorura acidă a ultimului compus a fost preparată prin reacţia cu clorură de tionil şi distilarea produsului. În continuare, toate etapele care conduc la [7-^{3}H]-eritro-sfingozină au fost realizate cu randamente înalte. Produsul de reacţie a fost caracterizat prin următoarele metode:

- spectrul IR al [7-^{3}H]triacetil-eritro-DL-sfingozinei;
- ozonoliza oxidativă a derivatului triacetil; a rezultat acid miristic radioactiv (identificat ca ester metilic), ca unic produs marcat de degradare.

8.4. Marcarea glicosfingolipidelor cu ^{35}S, ^{3}H şi ^{14}C

În repetate rânduri, nitrocatecolsulfatul a fost utilizat pentru a detecta deficienţa cerebrozid sulfatazei în leucodistrofia metacromatică. O imperfecţiune a acestei metode o constitiue posibila interferenţă a activităţii arilsulfatazei B. De asemenea, au fost măsurate activităţi foarte scăzute ale aril sulfatazei A în leucocite şi fibroblaşti provenite de la adulţi sănătoşi, rude ale pacienţilor cu leucodistrofie metacromatică. Utilizarea substraului natural mai este justificată şi prin existenţa formelor neobişnuite ale leucodistrofiei metacromatice în care hidroliza substratelor naturale este scăzută dar substratele artificiale sunt clivate cu viteză aproape normală. De aceea au fost preparate sulfogalactozil ceramide radiomarcate cu ^{35}S şi tritiu. Sulfolipidul marcat cu ^{35}S a fost obţinut iniţial prin injectarea anionului $^{35}SO_4^{2-}$ în creier de şobolan sau de iepure urmată de extracţia şi purificarea sulfatidului biosintetizat marcat. O limitare a acestei metode provine de la timpul de înjumătăţire relativ scurt al izotopului ^{35}S precum şi de la nereproductibilitatea radioactuivităţii specifice a substratului biosintetizat. Din aceste motive a fost preparat sulfogalactozil ceramidul marcat cu tritiu, prin tritierea catalitică a legăturii duble a sfingozinei. Un dezavantaj al acestei metode îl constituie radioliza substratului

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

sintetizat în cursul depozitării şi necesitatea unei radioactivităţi specifice înalte datorate randamentului scăzut de măsurare prin scintilaţie a tritiului. O altă modalitate de marcare a constituit-o încorporarea acidului gras radioactiv în galactozil ceramid prin intermediul clorurii de acil marcate şi a sfingolipidului deacilat. Ulterior această metodă a fost aplicată la prepararea N-stearoil[1-^{14}C]sulfogalactozilsfingozinei, prin utilizarea ca intermediar a sulfogalactozil sfingozinei. S-a găsit că la prepararea ultimului compus un parametru critic îl constituie temperatura, pentru a limita formarea galactozil ceramidului sau a galactozil sfingoziei. Lizosulfatidul a fost obţinut prin hidroliza cerebrozid sulfatului cu hidroxid de potasiu în n-butanol (G. Dubois şi colab., 1980).

Acidul sialic constă dintr-un grup de aproximativ 20 de derivaţi ai acidului neuraminic, cei mai mulţi dintre aceştia O-acetilaţi în poziţiile 4, 7, 8 şi/sau 9 (G. Reuter, şi R.Schauer, 1988). Lactoilarea pe C-9 a fost găsită în mai multe surse: ser, urină şi salivă umană (J. Haverkamp şi colab., 1976), mucina gastrică (A. P. Corfield şi colab., 1987), mucina nazală (G. Reuter şi colab., 1988), plasma sanguină de cabaline (G. Reuter şi colab., 1988), mucina submandibulară (G.Reuter şi colab., 1980), mucina din glanda submandibulară bovină (R. Schauer şi colab., 1976), ficat de păstrăv (R. G. Kleineder şi colab., 1993). Funcţia şi metabolismul acestui ultim tip de AS sunt necunoscute. S-a găsit însă că enzimele catabolismului AS (sialidaza, sialat O-acetil esteraza, sialat liaza) care acţionează pe acidul N-acetil neuraminic (Neu5Ac) sunt fie inactive fie cu puţin mai active pe acidul N-acetil-3-O-lactoilneuraminic (Neu5Ac9Lt) (R. Schauer şi colab., 1988).

Glicoconjugatele microzomale de cabaline au fost marcate cu [^{14}C] în felul următor: Fracţia microzomală din ficat a fost desializată prin încălzire cu HCl diluat şi dializată. Glicoproteinele solubile desializate au fost sialilate cu CMP-N-Ac-[4, 5, 6, 7, 8, 9, -^{14}C]neuraminat în prezenţa unei fracţii microzomale proaspete din acelaşi ţesut (care posedă sialil transferază).

Reacţia de lactoilare enzimatică a fost testată prin incubarea fracţiilor subcelulare din ficat de cabaline cu unul dintre următoarele substrate: [^{14}C]Neu5Ac, CMP-[^{14}C]Neu5Ac, glicoconjugate microzomale [^{14}C]-sialilate. AS modificat chimic a fost clivat din glicocojugate fie prin încălzire cu acidul formic fie cu acid acetic. AS a fost purificat prin cromatografie de schimb ionic pe Dovex 2X8.

AS, rezultat prin hidroliză în urma incubării unei fracţii cu CMP-[^{14}C]Neu5Ac, a comigrat cu Neu5Ac şi cu Neu5Ac9Lt; prin HAS peak-ul a dispărut şi a apărut peak-ul Neu5Ac. Incubarea Neu5Ac9Lt cu sialat O-acetilesterază din creier bovin, care hidrolizează grupările O-acetil ale Neu5,9Ac şi ale Neu5Ac9Lt.

Pentru studierea unor procese biochimice şi fiziologice, ca de ex., dinamica membranei sau interacţia dintre GSL şi glicoproteine, au fost preparate o serie de lizo-gangliozide şi derivaţi ai acestora, conţinând markeri fluorescenţi, markeri de spin sau izotopi stabili: deuteriu sau ^{13}C. Prin reacţia gangliozidului respectiv cu KOH în metanol, în atmosferă de argon, la 102°C au fost îndepărtate atât gruparea acetil din AS cât şi gruparea acil gras din porţiunea ceramidică. În locul AG a fost introdusă gruparea Fmoc sau benziloxicarbonil, prin reacţie cu Fmoc-Cl sau benzil cloroformiat. A urmat acetilarea selectivă a grupării amino din acidul neuraminic şi îndepărtarea grupării Fmoc prin hidroliză în amoniac lichid. Au fost preparaţi următorii compuşi: N-acetil-lizo-GM1, N-acetil-lizo-GM1 deuterat (prin reacţie cu anhidridă acetică total deuterată), monosialogangliotetraoză (de la gangliozidul GM1a), asialo-N-acetil-lizo-GM1a şi gangliozidul GM1a marcat cu acid palmitic[1-^{13}C] în porţiunea ceramidică. Ultimul compus a fost preparat prin reacţia lizo-derivatului cu N-succinimidil [1-^{13}C]hexadecanoat. Caracterizarea tuturor compuşilor s-a realizat prin FAB-MS (Tabelul 67) (S. Neuenhofer şi colab., 1985).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Tabelul 67. Ionii negativi caracteristici ai gangliozidelor şi derivaţilor acestora în spectrul de masă FAB[a].

Glicolipid	M-1	M-1-NeuAc	A1	A2	A3	A4	B1	B2	B3	B4
GD1a	1835 s	1544 s	564 m	726 m	1179 w	1382 w	470 w	673 w	1126 w	1288 nd
	1863 s	1572 s	592 m	754 m	1207 w	1410 w	468 w	671 w	1124 w	1286 nd
lizo-GD1a	1569 m	1278 m	298 nd	460 nd	913 w	1116 w	470 m	673 m	1126 w	1288 m
	1597 s	1306 s	326 nd	488 nd	941 m	1144 m	468 m	671 m	1124 w	1286 w
N-Fmoc-lizo-GD1a	1791 m	1500 m	520 nd	682 nd	1135 w	1338 w	470 m	673 nd	1126 nd	1288 nd
	1819 s	1528 s	548 nd	710 nd	1163 m	1366 m	468 m	671 nd	1124 nd	1286 nd
GM1	1544 s	1253 nd	564 s	726 m	1179 w	1382 nd	179	382 nd	835 m	997 w
	1572 s	1281 nd	592 s	754 m	1207 w	1410 nd	-	-	833 m	995 w
lizo-GM1	1278 nd	987 nd	298 nd	460 nd	913 nd	1116 nd	179	382 w	835 w	997 w
	1306 s	1015 w	326 nd	488 w	941 w	1144 w	-	-	833 m	995 w
N-Fmoc-lizo-GM1	1500 s	1209 nd	520 nd	682 nd	1135 w	1338 w	179	382 nd	835 m	997 w
	1528 s	1237 nd	548 w	710 nd	1163 m	1366 s	-	-	833 m	995 w
GM2	1382 s	1091 m	564 m	726 m	1179 w	-	-	220	673 m	835 w
	1410 m	1119 w	592 w	754 w	1207 w	-	-	-	671 m	833 m
lizo-GM2	1116 s	825 m	298 nd	460 w	913 w	-	-	220	673 m	835 w
	1144 w	853 w	326 nd	488 nd	941 w	-	-	-	671 m	833 w
GM3	1263 s	972 w	648 w	810 w	-	-	-	-	470 m	632 w
	1261 s	970 w	646 w	808 w	-	-	-	-	468 m	630 w
	1235 m	944 w	620 nd	782 w	-	-	-	-	-	-
	1233 w	942 nd	618 nd	780 nd	-	-	-	-	-	-
lizo-GM3	913 s	622 m	298 nd	460 w	-	-	-	-	470 m	632 m
	941 nd	650 nd	326 nd	488 nd	-	-	-	-	468 m	630 m
^{13}C-GM1[b]	1517 s	1226 w	537 w	699 w	1152 nd	1355 nd	179	382 w	835 s	997 w
	1545 s	1254 w	565 s	727 m	1180 nd	1383 nd	-	-	833 s	995 w

a Intensităţile relative ale ionilor negativi sunt indicate astfel: s, strong (intens); m, medium; w, weak (slab); nd, not detected. b gangliozidul GM1a a fost marcat cu acid palmitic[1-^{13}C] în porţiunea ceramidică.

Modul de fragmentare al gangliozidului GD1a la FAB este prezentat în Fig 34.

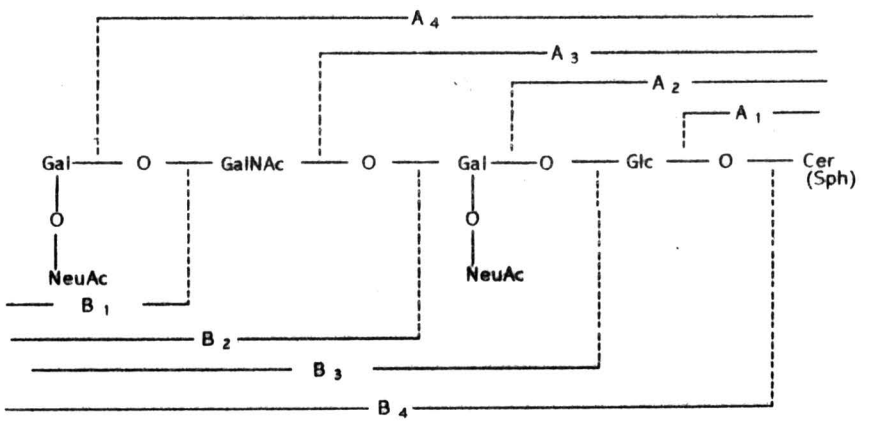


Fig. 34.Fragmentarea gangliozidelor (lizogangliozidelor) prin FAB.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Lizo-gangliozidul GM1a a fost preparat printr-o reacție decurgând într-o singură etapă, prin hidroliza alcalină cu hidroxid de potasiu în n-propanol și atmosferă de gaz inert (argon) a gangliozidului. Spectrul FAB al lizo-GM1a a avut următoarele caracteristici: ionii MH⁻ cu m/z 1281 și 1309 (măsurători de înaltă rezoluție au dat 1280,6233 și, respectiv, 1308,5872) au corespuns cu speciile moleculare conținând BCL cu C_{18} și, respectiv, C_{20} (formula $C_{55}H_{98}N_3O_{30}$ corespunde la 1280,6235 iar formula $C_{57}H_{102}N_3O_{30}$ corespunde la 1308,6548). Aceste valori concordă cu lizo-GM1a conținând grupări N-acetil legate la acidul sialic și la galactozamină. Au mai fost identificate multe alte fragmente spațiate la intervale de 28 uam, care au confirmat structura lizo-GM1. Totodată, au fost identificați ioni din domeniul maselor mici cu următoarele valori m/z: 292 (Neu5Ac), 282 și 310 (BCL). Descompunerea metastabilă unimoleculară a moleculelor protonate a dat naștere la o pierdere pronunțată de acid sialic (-291u; m/z 989/1017) și la o pierdere a fragmentului Gal-GalNAc- terminal (-364u; m/z 916/944) (S. Sonino și colab., 1992).

Gangliozidul GM1a din creier bovin a fost separat cromatografic pe Lichroprep Si 60 în două componente, 1 și 2 (conținând C_{18} și, respectiv, C_{20} sfingozină). Pentru fiecare componentă s-a preparat apoi mono-N-acetil-lizoGM1 și de-N-acetil-lizoGM1, prin încălzire cu KOH în n-butanol. Dintre cele două grupări N-acetil din gangliozidul GM1a, cea legată de fragmentul sialosil și cea legată de N-acetil-galactozamină, mai stabilă este ultima. Măsura de-N-acetilării a fost controlată cinetic. Caracteristicile ionilor negativi de la analiza FAB-MS sunt prezentate în Tabelul 68 (G. Cavallo și colab., 1993).

Tabelul 68.Caracteristica m/z a ionilor negativi a unor derivați ai gangliozidului GM1a*.

Fragment	LizoGM1a		Mono-N-Ac-lizoGM1a		De-N-Ac-lizoGM1a	
	C-18	C-20	C-18	C-20	C-18	C-20
M-1	1278, nd	1306, s	1236, s	1264, s	1194, s	1222, s
(M-1)-NeuAc	987, nd	1015, w	987, w	1015, w	945, w	973, w
A1	298, nd	326, nd	298, w	326, w	298, w	326, w
A2	460, nd	488, w	460, w	488, m	460, m	488, m
A3	913, nd	941, w	871, w	899, m	871, w	899, m
A4	1116, nd	1144, w	1074, m	1102, m	1032, m	1060, m
B1	179, w	179, w	179, w	179, w	179, w	179, w
B2	382, w	nd	364, w	382, w	340, w	340, w
B3	835, w	833, m	791, m	791, m	749, m	749, m
B4	997, w	995, w	955, w	955, w	913, w	913, m

* Intensitățile relative ale ionilor negativi sunt ilustrate astfel: s, strong (intens); m, medium; w, weak (slab); nd, not detected.

Pentru a hidrogena gruparea carboxil a acidului sialic din gangliozide s-a procedat în felul următor. Gangliozidul respectiv, ca sare de sodiu, a fost dizolvat în DMSO și tratat cu iodură de metil. Esterii metilici au fost purificați cromatografic pe coloană de Sep-Pak C18. Esterul metilic al gangliozidului GM1a a indicat absorbție la 1750 cm^{-1} datorată legăturii carboxil-ester. Esterul metilic al gangliozidului a fost hidrogenat cu $NaBH_4$ în metanol. Produsul de reacție a fost purificat prin cromatografie pe coloană de Sep-Pak C18 sau prin dializă (în cazul gangliozidelor mai puțin solubile în apă, ca de ex GM2 sau GM3). Prin hidrogenare cu borohidrură de sodiu a dispărut banda de absorbție de la 1750 cm^{-1}. Pentru analiza acidului sialic derivatizat, gangliozidele au fost supuse la HAS iar produșii de reacție au fost analizați ca derivați O-trimetilsilil.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Spectrul de masă cu ioni secundari a gangliozidului GM2 modificat a indicat o strămutare a ionului cvasimolecular. Astfel ionul $(M+Na)^+$ are valoarea 1406 pentru GM2, 1420 pentru esterul metilic al GM2 şi 1392 pentru GM2 hidrogenat cu borohidrură de sodiu. În toate spectrele, ionul fragmentului asialo a avut valoarea m/z egală cu 1115, ceea ce a indicat că modificarea chimică a avut loc exclusiv pe fragmentul de AS (S. Handa şi K. Nakamura, 1984).

Gangliozidul GM1a conţinând o legătură tioglicozidică cu ceramidul marcat cu ^{14}C a fost preparat de către G. Schwarzmann şi colab., (1997) sub forma a doi compuşi. Etapele de lucru au fost următoarele. Monosialogangliotetraoza provenită din gangliozidul GM1a a fost acetilată total cu Ac_2O/piridină, formându-se şi o lactonă. Gruparea acetoxi glicozidică (raport ß:α= 1,7 , după cun, a rezultat din cuantificarea semnalului de la 5,70 ppm) a fost înlocuită cu brom, prin reacţia monosialogangliotetraozei peracetilate cu HBr/AcOH. Atomul de brom din α-bromoderivat a fost înlocuit cu o grupare tioacetil, prin reacţie cu KSAc/metanol. av-bromoderivat a fost înlocuit cu o grupare tioacetil, prin reacţie cu KSAc/metanol. Având loc şi o inversie de configuraţie. Condensarea dintre tetradeca-O-acetil-1-S-acetil-1-tio-ß-monosialogangliotetraoză sialil-II^2-lactonă şi (2R, 3R, 4E)-3-O-benzil-2-dicloroacetamido-1-iod-4-octadecen-3-ol a dus la un ß-tioglicozid, mai precis un lizo-SGM1a protejat. Grupările protectoare au fost îndepărtate prin HAS obţinându-se lizo-SGM1a. N-Acilarea selectivă a lizo-SGM1a cu derivatul N-succinimidoil a acidului octanoic[1-^{14}C] a dus la S-ß-monosialogangliotetraozil-(1-1)-(2R,3R,4E)-2-octanoatamido[1-^{14}C]-3-hidroxi-4-octadecenă. Caracteristicile FAB-MS ale compusului sunt următoarele: $C_{63}H_{111}N_3O_{30}S$ dă MM= 1422,63; au fost decelaţi $[M+H^+]$ la m/z 1424 şi $[M+Na^+]$ la m/z 1446. Deplasarea cu 2 uam la ionii observaţi este datorată abundenţei înalte a izotopului ^{14}C. În mod similar a fost obţinut compusul S-ß-monosialogangliotetraozil-(1-1)-(2R,3R,4E)-2-octadecanoatamido[1-^{14}C]-3-hidroxi-4-octadecenă. Caracteristicile FAB-MS ale compusului sunt următoarele: $C_{73}H_{131}N_3O_{30}S$ dă MM= 1562,90; au fost decelaţi $[M+H^+]$ la m/z 1564 şi $[M+Na^+]$ la m/z 1586. ŞI în acest caz deplasarea cu 2 uam la ionii observaţi este datorată abundenţei înalte a izotopului ^{14}C.

VERIFICAT 2007
BIBLIOTECA CENTRALĂ BUCUREŞTI
VERIFICAT 2017
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Tiparul s-a executat sub c-da nr. 536/1999,
la Tipografia Editurii Universităţii din Bucureşti

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

ISBN: 973-575-424-X

Lei 28600

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro